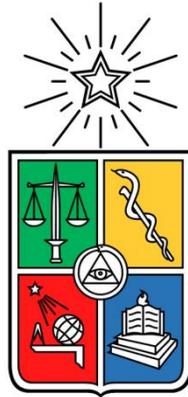


UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACÉUTICAS



Efecto del acetato y formato sobre la capacidad de *E. coli* productora de toxina Shiga y *E. coli* enteroagregativa de aumentar la expresión de genes asociados a la virulencia e inducir la secreción de IL-8 en células epiteliales intestinales

**Tesis presentada a la Universidad de Chile para optar grado de Magíster en Bioquímica
área de Especialización en Bioquímica Clínica**

Claudio Daniel Girón Reyes

Director de Tesis: Dr. Mauricio Farfán Urzúa

Santiago-Chile

Junio 2020

UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACÉUTICAS

INFORME DE APROBACIÓN DE TESIS DE MAGÍSTER

Se informa a la Dirección de la escuela de Graduados de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas que la Tesis de Magíster presentada por el candidato

Claudio Daniel Girón Reyes

Ha sido aprobada por la comisión Evaluadora de Tesis como requisito para optar al grado de Magíster en Bioquímica, Área de Especialización en Bioquímica Clínica en el examen público rendido el día.

Director de Tesis:

Dr. Mauricio Farfán Urzúa _____

Comisión Evaluadora de Tesis:

Dr. Carlos Santiviago _____

Dr. Sergio Álvarez _____

Dra. Caroll Beltrán _____

Financiamiento

Esta tesis de Magíster se realizó en el Centro de Estudios Moleculares de la Facultad de Medicina, Universidad de Chile - Hospital Dr. Luis Calvo Mackenna. Fue dirigida por el Dr. Mauricio Farfán Urzua y financiada por el proyecto FONDECYT 1160426.

Agradecimientos

Al Dr. Mauricio Farfán por su constante apoyo y dedicación durante este proceso de aprendizaje.

A mis compañeros de laboratorio en investigación Mariana, Pablo, Joaquín y Mauricio por sus enseñanzas dentro y fuera del laboratorio.

A la Dra. Daniela Seelenfreund por su orientación y confianza.

A mis padres Claudio y Karen por el sacrificio económico y apoyo emocional.

A mis hermanas Karen y Klaudeth.

A mis abuelos Cesar y Digna.

A mi amada Bárbara y a su familia Oscar, América y Mayte por acogerme en su caluroso hogar y por todas las lindas experiencias compartidas.

A Richard Pino por su amistad sincera y compañerismo.

Al programa de becas Honduras 2020 por el apoyo económico brindado.

Índice General

Abreviaturas.....	IX
Resumen	X
Summary	XII
Introducción.....	1
Mecanismo de patogenicidad de STEC.....	3
Mecanismo de patogenicidad de EAEC	5
Microbiota Intestinal.....	6
Microbiota intestinal en infecciones por ECD	7
SCFA y patogenicidad.....	11
Hipótesis	13
Objetivo General.....	13
Objetivos Específicos.....	13
Materiales y Métodos	14
Objetivo específico 1.....	14
Objetivo específico 2.....	17
Objetivo específico 3.....	19
Objetivo específico 4.....	21
Análisis estadístico.....	22
Resultados objetivo específico 1	23
Resultados objetivo específico 2.....	28
Resultados objetivo específico 3.....	29
Resultados objetivo específico 4.....	32
Discusión	33
Modelo de resultados.....	39
Conclusiones	40

Bibliografia.....41

Índice de Figuras

Figura 1. Principales patotipos de ECD.....	2
Figura 2. Modelo de infección de STEC en humanos.....	4
Figura 3. Etapas de la patogénesis de EAEC.....	6
Figura 4. Microbiota asociada a infecciones por ECD.....	8
Figura 5. <i>Bacteroides thetaiotamicron</i> aumenta factores de virulencia en STEC.....	9
Figura 6. Secreción de IL-8 en células epiteliales intestinales infectadas con STEC y EAEC incubadas con el sobrenadante de <i>E. albertii</i>	10
Figura 7. Esquema de realización de curva de crecimiento	15
Figura 8. Esquema del procedimiento usado para la evaluación de la expresión génica en cepas de STEC y de EAEC en presencia de acetato y formato.....	16
Figura 9. Esquema general de infección con cepas de ECD preincubadas con SCFA.....	19
Figura 10. Esquema utilizado en la infección de células epiteliales con cepas de ECD preincubadas con exceso de SCFA fisiológico.....	21
Figura 11. Curva de crecimiento de STEC en concentraciones crecientes de acetato.....	24
Figura 12. Curva de crecimiento de STEC en concentraciones crecientes de formato.....	24
Figura 13. Curva de crecimiento de EAEC en concentraciones crecientes de acetato	25
Figura 14. Curva de crecimiento de EAEC en concentraciones crecientes de formato	25
Figura 15. Efecto del acetato sobre la expresión de los genes de virulencia de STEC	26
Figura 16. Efecto del formato sobre la expresión de los genes de virulencia de STEC.....	27
Figura 17. Efecto del acetato sobre la expresión de los genes de virulencia de EAEC.....	27
Figura 18. Efecto del formato sobre la expresión de los genes de virulencia de EAEC	27
Figura 19. Secreción de IL-8 en células epiteliales intestinales infectadas con STEC incubadas con acetato y formato	28
Figura 20. Secreción de IL-8 en células epiteliales intestinales infectadas con EAEC incubadas con acetato.....	29
Figura 21. Curva de crecimiento de STEC en concentraciones de SCFA presentes en íleon y colon humanos.....	29

Figura 22. Curva de crecimiento de EAEC en concentraciones de SCFA presentes en íleon y colon humano.....	30
Figura 23. Efecto del SCFA fisiológicos en íleon y colon humano sobre la expresión de los genes de virulencia de STEC y EAEC.....	31
Figura 24. Efecto del exceso de acetato y formato sobre en los valores fisiológicos de SCFA en íleon y colon sobre la expresión de los genes de virulencia de STEC y EAEC	31
Figura 25. Secreción de IL-8 en células epiteliales intestinales infectadas con la cepa de STEC y EAEC incubadas con exceso de SCFA.....	32
Figura 26. Modelo de resultados para STEC.....	39
Figura 27. Modelo de resultados para EAEC.....	39

Índice de Tablas

Tabla 1. Especies bacterianas indicadoras asociadas a la infección por ECD.....	8
Tabla 2. Estudio de metabolómica a sobrenadante de <i>E. albertii</i>	10
Tabla 3. Secuencia de partidores utilizados en este estudio	17

Abreviaturas

μg	microgramo
μl	microlitro
ADN	Ácido Desoxirribonucleico
ARN	Ácido Ribonucleico
DO	Densidad Óptica
DMEM	Medio de Eagle modificado por Dulbecco
DMEM HG	DMEM alto en glucosa
ELISA	Ensayo por Inmunoabsorción Ligado a Enzimas
HRP	<i>Peroxidasa de rábano</i>
LB	Medio Luria Bertani
ml	mililitro
MOI	Multiplicidad de infección
PBS	Buffer Fosfato Salino
r.p.m.	revoluciones por minuto
SFB	Suero Fetal Bovino
TMB	<i>Tetrametilbenzidina</i>
UFC	Unidades Formadoras de Colonias

Resumen

Las cepas de *Escherichia coli* (*E. coli*) diarreogénicas (ECD) son bacilos Gram negativo que se caracterizan por su plasticidad génica y capacidad de generar diarrea. Estas cepas se han agrupado en distintos patotipos, distinguiéndose cada uno por sus factores de virulencia y mecanismos de patogenicidad para colonizar el intestino.

El microambiente intestinal cumple un papel importante en la regulación de la virulencia en los patógenos entéricos, pudiendo ser la microbiota intestinal uno de los factores involucrados en modular la interacción entre ECD y el hospedero. En nuestro laboratorio se realizó un estudio que encontró la existencia de una microbiota distintiva en pacientes que presentaban diarrea asociada a la presencia de ECD, distinguiéndose significativamente en este grupo la presencia de la bacteria *Escherichia albertii* (*E. albertii*).

En ensayos de infección sobre células intestinales T84, utilizando las cepas de ECD productora de toxina Shiga (STEC) y enteroagregativa (EAEC) co-incubadas con el sobrenadante de un cultivo de *E. albertii*, se observó un aumento significativo en la secreción de la citoquina proinflamatoria IL-8 en comparación a la condición control. Un análisis de cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas del sobrenadante de *E. albertii* reveló la presencia de los ácidos grasos de cadena corta (SCFA) acetato y formato.

Los SCFA son producidos principalmente a partir de la fermentación de carbohidratos no digeribles en el intestino y se han sido descrito como moléculas reguladoras de la virulencia de enteropatógenos. Con estos antecedentes, en este trabajo se propuso estudiar el rol del acetato y el formato en la expresión de factores de virulencia en STEC y EAEC, junto con evaluar el efecto en la inducción de la respuesta inflamatoria inducida por estos patógenos en células epiteliales intestinales. Nuestra hipótesis es que el acetato, formato y los SCFA a concentraciones fisiológicas humanas inducen un aumento de la expresión de genes involucrados en la virulencia de cepas de STEC y de EAEC, correlacionado con un aumento en la secreción de IL-8 en células epiteliales intestinales *in vitro* infectadas con estos patógenos. El objetivo general de la tesis es determinar el efecto del acetato, formato y los SCFA en concentraciones fisiológicas humanas en la expresión de genes involucrados en la virulencia en STEC y EAEC, y en la secreción de IL-8 en células epiteliales intestinales mediada por estos patotipos.

En primer lugar, se determinó que concentraciones de acetato mayores a 100 mM retrasan el crecimiento bacteriano de STEC y EAEC en comparación a su control de osmolaridad (NaCl). Posteriormente se encontró que el formato y el acetato aumentan la expresión de los genes que codifican para la toxina Shiga (*stx2*) e intimina (*eae*) en STEC y la proteína autotransportadora Pet (*pet*) en EAEC. No se encontraron diferencias significativas en el efecto del acetato y el formato sobre STEC y EAEC en la capacidad de inducir secreción de IL-8 sobre células T84 en comparación a su respectivo control. Además, se evaluó el efecto de los SCFA en un contexto fisiológico humano, y se observó que al incubar STEC o EAEC en presencia de la condición de SCFA presentes en colon, aumentó la expresión de los genes *stx2* y *eae* en STEC, en EAEC aumentó la expresión de los genes; regulador maestro de virulencia (*aggR*), fimbria de adherencia agregativa (*aafA*) y autotransportador Pet. No se observó un efecto significativo en la inducción de la secreción de IL-8 en las células T84, cuando las cepas de STEC y de EAEC se incubaba en presencia de un exceso de formato y acetato sobre la condición fisiológica de SCFA en colon.

Como conclusión, en este trabajo se observó que el formato, y los SCFA presentes en el colon, modulan positivamente la expresión de factores de virulencia en STEC y EAEC. También se observó que un aumento en la expresión de los genes evaluado en las cepas de ECD, no se traduce en un aumento en la secreción de IL-8 en el modelo celular utilizado. Estos resultados sugieren que los SCFA podrían participar en la regulación de virulencia de las cepas de ECD.

Summary

Diarrheagenic *E. coli* (DEC) are Gram negative bacilli that have been characterized by their gene plasticity and ability to generate diarrhea. These strains have been grouped into different pathotypes, each being distinguished by their virulence factors and pathogenic mechanisms to colonize the human gut.

Human gut microenvironment has an important role in the regulation of virulence of enteric pathogens, being the intestinal microbiota one of the factors that could be involved in modulating the interaction between DEC and the host. A study carried out in our laboratory determined the existence of a distinctive microbiota in patients presenting diarrhea associated with the presence of DEC, significantly distinguishing in this group the presence of *Escherichia albertii* (*E. albertii*).

Infection assays were performed on T84 intestinal cells using shiga Toxin-producing *E. coli* (STEC) and enteroaggregative *E. coli* (EAEC), which were co-cultured with the supernatant of *E. albertii*, producing an increase in the secretion of the IL-8 proinflammatory cytokine compared to the control condition. A gas chromatography analysis coupled to spectrometry would reveal the presence of short chain fatty acids (SCFA), acetate and formate in the supernatant of *E. albertii*.

SCFA are produced through the fermentation of none digestible carbohydrates (NDC) in the human gut and have been described as molecules involved in the modulation of virulence factors in enteropathogenic bacteria. In this study we proposed that the acetate, formate and SCFA in a human physiological context induce an upregulation in the expression of virulence factors in STEC and EAEC, increasing the secretion of IL-8 on epithelial cells *in vitro* infected with these pathogens. The main objective in this study was to determine the effect that the formate, acetate and SCFA in the human gut could have in the expression of virulence factors in STEC and EAEC, and to evaluate the secretion on IL-8 on epithelial cells infected with these pathogens.

It was first determined that acetate concentrations greater than 100 mM have a significant effect on the bacterial growth of STEC and EAEC compared to their osmolarity control, sodium chloride (NaCl). Subsequently, it was determined that acetate and formate increased gene expression of Shiga toxin (*stx2*) and intimin (*eae*) in STEC and the autotransporter protein (*pet*) in EAEC. There is no significant difference in the effect of acetate and formate on STEC and EAEC to induce secretion of IL-8 on T84 cells compared to their respective control. In addition, the effect of SCFA

in a human physiological context was evaluated, and it was observed that when incubating STEC or EAEC in the presence of concentrations of SCFA present in the colon, the expression of the genes *stx2*, and *eae* increased in STEC, as well as the genes that encode the master regulator (*aggR*), fimbria of aggregative adhesion (*aafA*) and *pet* in EAEC. It was observed that there is no significant effect on the induction of IL-8 secretion in T84 cells, when STEC and EAEC are incubated in the presence of an excess formate and acetate on the physiological condition of SCFA in the colon.

In this work we concluded that formate, acetate and the SCFA present in the colon, positively modulate the expression of certain virulence factors in STEC and EAEC. It was also observed that an increase in the expression of the evaluated genes in DEC strains does not translate into an increase in the secretion of IL-8 in the cellular model used. These results suggest that the SCFA could participate in the virulence regulation of DEC strain.

Introducción

Escherichia coli diarreogénica

La diarrea se define por el aumento en el volumen, frecuencia, fluidez y la pérdida de la consistencia sólida de las deposiciones, afectando principalmente a individuos entre 1-5 años de edad (Koletzko y cols., 2009). La diarrea está ligada a la ingesta de agua y/o alimentos contaminados, acompañada de hábitos deficientes en la higiene personal (Kapwata y cols., 2018).

Un estudio publicado en el año 2016 enfocado en caracterizar los patógenos presentes en deposiciones diarreicas, reveló que un 30% del total de las muestras analizadas tenía la presencia de agentes virales en las deposiciones, un 8% de las muestras tenía agentes parasitarios y un 62% estaba asociado a la presencia de bacterias. De este último grupo se observó que un 62% de las bacterias encontradas pertenecía al grupo de las *Escherichia coli* (*E. coli*) diarreogénicas (ECD) (Farfan y cols., 2016).

E. coli es un bacilo Gram negativo, anaerobio facultativo que pertenece a la familia *Enterobacteriaceae* (Ewing, 1986). Esta bacteria comensal está ampliamente distribuida en el intestino humano (Kaper y cols., 2004). No obstante, estas cepas comensales de *E. coli* han adquirido distintos factores de virulencia mediante transferencia horizontal de genes o bacteriófagos dando como resultado cepas patogénicas que producen diarrea, identificadas como *E. coli* diarreogénicas (Nataro y cols., 1998).

Existen distintos patotipos de ECD, y cada uno posee mecanismos de patogenicidad acompañado de factores de virulencia característicos que les permiten causar daño en el hospedero de manera distintiva. En cuanto a la clasificación, existen al menos 6 patotipos principales (**Figura 1**): *E. coli* enteropatogénica (EPEC), *E. coli* productora de toxina Shiga (STEC), *E. coli* enterotoxigénica (ETEC), *E. coli* enteroagregativa (EAEC), *E. coli* enteroinvasiva (EIEC) y *E. coli* con adherencia difusa (DAEC) (Kaper y cols., 2004; Nataro y cols., 1998). Al igual que la mayoría de los patógenos entéricos, las cepas de ECD siguen una estrategia de infección que se resume de la siguiente manera: (I) colonización de mucosa intestinal, (II) producción/secreción de factores de virulencia (III) producción de inflamación y diarrea (Nataro y cols., 1998). En este trabajo se estudiaron 2 patotipo de ECD por su relevancia clínica y prevalencia: STEC y EAEC.

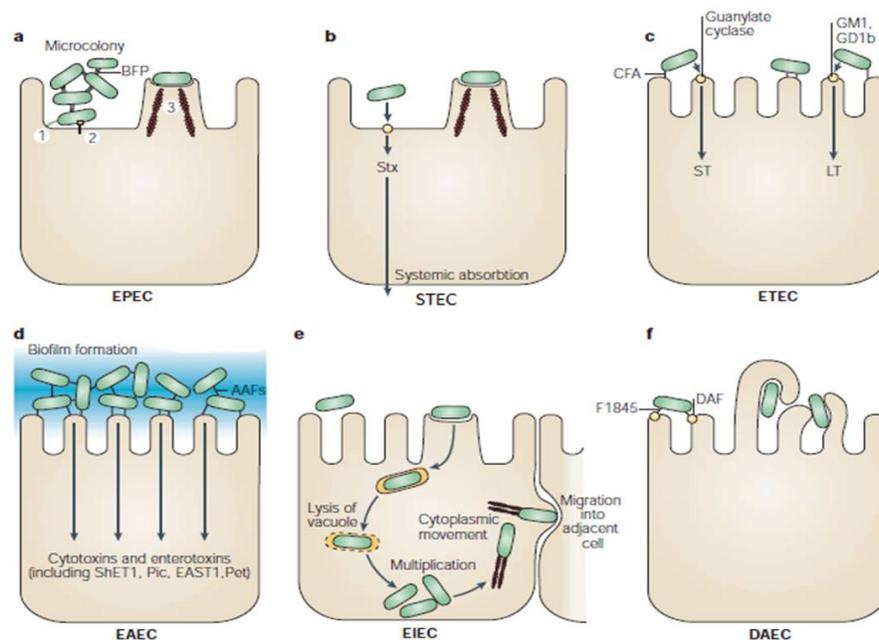


Figura 1. Principales patotipos de ECD. a- EPEC se distingue por la formación de pedestales de actina en células de intestino delgado. b.- STEC genera adherencia en células de intestino grueso y se distingue por secretar la toxina Shiga (*stx2*) hacia tejido vascular. c- ETEC se adhiere a enterocitos en íleon y posee capacidad de secreción de toxinas termolábiles y termoestables generando diarrea acuosa. d- EAEC posee capacidad de adherencia en enterocitos de colon en una forma distintiva de apilamiento bacteriano. e- EIEC es el único patotipo que invade colonocitos, realiza lisis del fagosoma intracelular y se desplaza a través de los filamentos de actina. f- DAEC genera una señal en enterocitos de íleon que se manifiesta con el alargamiento de las microvellosidades. Modificado de Kaper y cols., 2004.

Mecanismo de patogenicidad de STEC

Este patógeno se caracteriza por producir una o más toxinas Shiga similares a las producidas por *Shigella dysenteriae*, por lo que se les denomina shigatoxigénicas (O'Brien y cols., 1983). Es un patógeno de carácter zoonótico de gran importancia en salud pública, que causa dolor abdominal, diarrea sanguinolenta y fiebre. Es el principal agente etiológico del síndrome hemolítico urémico (SHU) el cual se desarrolla en el 15% de los casos infectados por STEC produciendo anemia hemolítica, trombocitopenia y falla renal (Nguyen y cols., 2012; Obata y cols., 2008).

Con respecto a los mecanismos de patogenicidad de STEC, primero existe interacción bacteria-hospedero a nivel de enterocitos mediada inicialmente por la fimbria polar larga (Lpf). Luego STEC utiliza la proteína de adherencia intimina (*Eae*) para acercarse a la proteína de la membrana extracelular nucleolina, facilitando el acercamiento hacia la superficie del enterocito. Posteriormente, mediante el sistema de secreción Tipo III (T3SS), el cual consiste en una especie de jeringa macromolecular que desencadena señales intracelulares, STEC realiza traslocación de Tir (receptor traslocado de intimina) a la membrana celular donde finalmente se une a intimina. Esta fijación de STEC a la célula genera modificación en la actina, causando alargamiento de los enterocitos en forma de pedestales y produce lesiones de tipo adherencia y eliminación (A/E) características de este patotipo (Sinclair y cols., 2002; Fitzhenry y cols., 2002; McDaniel y cols., 1995).

Una vez concretada la unión entre bacteria y el enterocito, STEC secreta la toxina Shiga (Stx2), compuesta por una subunidad A y un pentámero B. La subunidad A tiene dos fragmentos, A1 con actividad enzimática y unión al receptor globotriaosilceramida 3 (Gb3) presente mayormente en células renales y A2 que se une al pentámero B. Al realizarse la unión de la subunidad A1 con Gb3, se genera actividad enzimática sobre el ARNr 28S, inhibiendo la síntesis proteica y

Mecanismo de patogenicidad de EAEC

Las alteraciones intestinales causadas por EAEC son frecuentemente asociadas a diarrea aguda o persistente, tanto en niños, adultos o pacientes inmunocomprometidos en países industrializados y en vías de desarrollo (Gantois y cols., 2006).

Este patotipo se adhiere a la mucosa intestinal, la coloniza y produce un efecto citotóxico. La adherencia de esta bacteria exhibe la formación de microcolonias (Mohamed y cols., 2007) y un patrón de adherencia-agregativa (AA) mediadas por fimbrias de adherencia agregativa (AAF) con diámetros de 3 nm sobre células Hep-2 y HeLa descrito como “ladrillos apilados“ (Hicks y cols., 1998). EAEC alberga un plásmido de adherencia agregativa (plásmido pAA), que codifica varios factores de virulencia, dentro de los que se incluye la fimbria AAF y el regulador AggR, un activador transcripcional que se encuentra principalmente en las cepas involucradas en causar episodios de diarrea aguda (Nataro y cols., 1994; Morin y cols., 2013). EAEC posee factores no regulados por AggR como las proteínas con actividad serin-proteasas (SPATE) o Pic, involucrada en la colonización junto a la toxina autotransportadora Pet (Morin y cols., 2013). La toxina Pet es una proteína que tiene afinidad con la espectrina en la membrana del complejo de Golgi, bloquea su función y causa el redondeamiento de la célula (**Figura 3**) (Eslava y cols., 1998). En relación al proceso inflamatorio inducido por EAEC, estudios previos revelan que existen niveles mayores de IL-8 en deposiciones de pacientes infectados por cepas de EAEC que contienen los genes *aggR* o *aafA* en comparación a pacientes infectados con patotipos de EAEC que no poseen estos factores de virulencia, dando origen al nombre para este patotipo de EAEC atípica (Steiner y cols., 1998). En otros estudios se observó la participación de la toxina Pet en la secreción de IL-8 en células epiteliales intestinales (Harrington y cols., 2005; Rocha-Ramírez y cols., 2016).

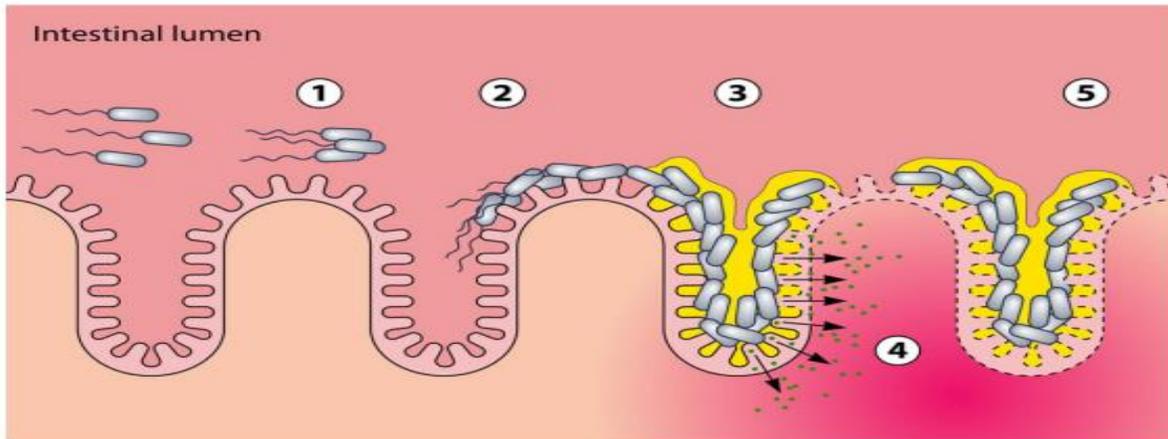


Figura 3. Etapas de la patogénesis de EAEC. Los números en los círculos indican un modelo de la progresión de EAEC en la patogénesis. 1) Aglutinación bacteriana. 2) Adherencia y colonización al epitelio intestinal. 3) Formación de biopelícula. 4) Liberación de toxinas bacterianas, inducción de daño. 5) Formación de biopelícula adicional. Modificado de Hebbelstrup Jensen y cols., 2014.

Todos estos eventos ocurridos en la patogenicidad de ECD se llevan a cabo en el intestino humano.

En el último tiempo, se ha acumulado evidencia sobre el rol de la microbiota intestinal y sus metabolitos en la regulación de la virulencia de los patotipos de ECD.

Microbiota intestinal

El tracto gastrointestinal (GI) humano representa una de las partes más extensa del cuerpo (250–400 m²). El número de microorganismos que lo habitan se estima que excede 10¹⁴, una proporción estimada de 10 veces más bacterias que células humanas (Bengmark, 1998). Esta comunidad bacteriana ofrece muchos beneficios al hospedero como el establecimiento de una microbiota normal que fortalece la integridad intestinal (Natividad y cols., 2013) y proporciona metabolitos como aporte de energía a enterocitos (den Besten y cols., 2013), protección contra patógenos y regulación de la inmunidad (Bäumler y cols., 2016). No obstante, el desbalance de todos estos mecanismos podría generar alteración en la composición microbiana conocida como disbiosis (Bäumler y cols., 2016).

La microbiota normal es aquella microbiota presente en individuos sanos. Existen cuatro *phylum* bacterianos presentes en la microbiota intestinal normal: Bacteroidetes, Firmicutes, Actinobacteria y Proteobacteria. Los géneros más abundantes pertenecientes a Bacteroidetes son *Bacteroides* y *Prevotella*, mientras que en el caso de Firmicutes los géneros más abundantes son *Clostridium*, *Eubacterium* y *Lactobacillus*. En Actinobacteria se encuentra en mayor proporción *Bifidobacterium* y el caso de Proteobacterias quien ocupa el mayor espacio en la microbiota es el género *Escherichia* (Wu y cols., 2011; David y cols., 2014). En situación de diarrea existe una mayor distribución del *phylum* Proteobacteria, estableciendo un nicho en el tracto gastrointestinal y reduciendo el número de bacterias presentes en la microbiota pertenecientes al resto de los *phylum* bacterianos antes mencionados (Stecher y cols., 2007).

Microbiota intestinal en infecciones por ECD

En nuestro laboratorio se caracterizó la microbiota intestinal en niños menores de 5 años asociados a infecciones por ECD (Gallardo y cols., 2017). En el estudio se analizaron 93 muestras de deposición en niños de 1-5 años. Estas muestras se dividieron en tres grupos que se clasificaron como: grupo control (30 muestras sin presencia de patógenos), grupo viral (31 muestras asociadas a diarrea con presencia de virus entéricos) y grupo ECD (32 muestra con presencia de algún patotipo de ECD). Este estudio reveló que existen diferencias significativas en la composición de la microbiota intestinal entre las muestras que pertenecen al grupo ECD en comparación a las muestras diarreicas del grupo asociado a virus entéricos y niños sanos (**Figura 4**). Este estudio también reveló la presencia de 8 bacterias en el grupo de ECD que se diferenciaban estadísticamente por criterios de presencia y abundancia relativa con respecto a los demás grupos (**Tabla 1**). De este análisis se determinó a *E. albertii* como una de las bacterias que presenta mayor significancia estadística.

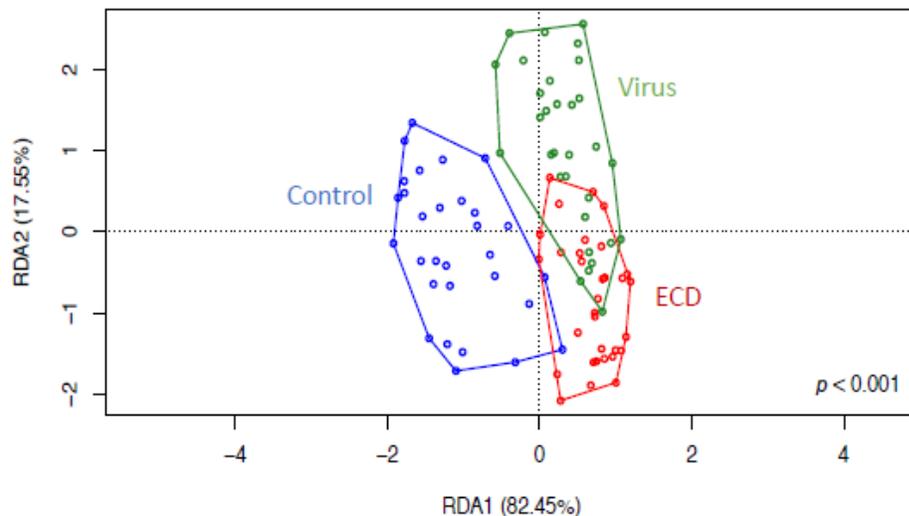


Figura 4. Microbiota asociada a infecciones por ECD. Análisis de redundancia ubica en el espacio cada una de las muestras (puntos) analizadas de acuerdo al grupo al que pertenecen, indicando una microbiota característica para el grupo ECD, grupo control y grupo viral. Modificado de Gallardo y cols., 2017.

Tabla 1. Especies bacterianas indicadoras asociadas a la infección por ECD. Se identificaron 8 especies indicativas para el grupo ECD, las cuales pertenecen al *phylum* Proteobacteria. Son indicativos de significancia estadística el Valor stat cercano a 1 y valor P menor a 0.05. Modificado de Gallardo y cols., 2017.

OPU N°	Nombre de OPU	Especies cercanas	Número de acceso	Valor stat	Valor P
464	<i>uncultured Escherichia</i>	<i>Escherichia coli</i>	CP007393	0.607	0.001
84	<i>uncultured Escherichia-Shigella</i>	<i>Escherichia coli</i>	X80725	0.535	0.002
120	<i>Citrobacter werkmanii</i>	<i>Citrobacter werkmanii</i>	AF025373	0.500	0.001
451	<i>Escherichia albertii</i>	<i>Escherichia albertii</i>	AJ508775	0.500	0.001
129	<i>Uncultured Klebsiella</i>	<i>Klebsiella oxytoca</i>	AF129440	0.452	0.007
459	<i>Enterobacter sp. Nj-68</i>	<i>Enterobacter sp.</i>	AM491469	0.437	0.003
81	<i>Haemophilus sputorum</i>	<i>Haemophilus sputorum</i>	JF506642	0.356	0.048
449	<i>Yersinia enterocolitica subs. palearctica</i>	<i>Yersinia enterocolitica</i>	CP002246	0.354	0.028

E. albertii es un bacilo Gram negativo y anaerobio facultativo que pertenece a la familia *Enterobacteriaceae*. Es un enteropatógeno emergente en humano y aves que presenta similitudes con bacterias como EPEC o EHEC, tal como la presencia de intimina o T3SS (Janda y cols., 1999; Oaks y cols., 2010).

La interacción entre patotipos de ECD con bacterias presentes en la microbiota intestinal ya ha sido motivo de estudio en el pasado. Un ejemplo es la interacción entre STEC y

Bacteroides thetaiotamicron (**Figura 5**), donde se demostró mediante experimentos de co-incubación, que la interacción entre ambas bacterias produce un aumento en la expresión de genes asociados a virulencia en STEC. También se observó bajo el mismo estímulo, un aumento en la adherencia de STEC sobre células epiteliales (Curtis y cols., 2014).

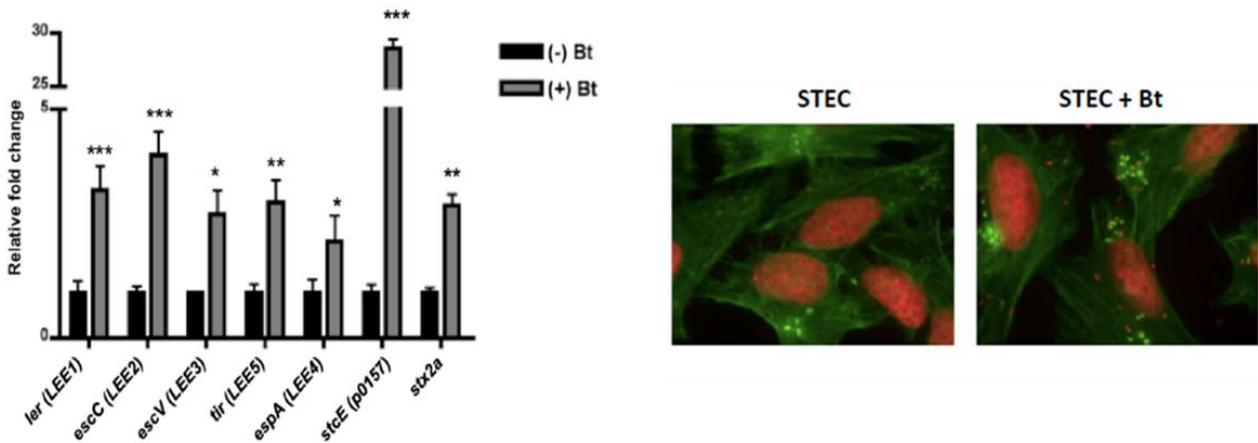


Figura 5. *Bacteroides thetaiotamicron* aumenta la expresión de factores de virulencia en STEC. Genes asociados a la virulencia en STEC aumentan su expresión en presencia de *Bt* con respecto a un control sin *Bt*. Además, se observó un aumento en la formación de pedestales de actina en presencia de *Bt* sobre células epiteliales intestinales. Modificado de Curtis et al., 2014.

Con estos antecedentes, en nuestro laboratorio realizaron ensayos de co-cultivo utilizando las cepas de STEC y de EAEC en presencia del sobrenadante de *E. albertii* para realizar ensayos de infección sobre células T84 y medir secreción de IL-8 (Datos no publicados) (**Figura 6**). En estos ensayos se observó que existía un aumento significativo ($p < 0.05$) en la secreción de IL-8 cuando se infectaron células T84 utilizando los patotipos de ECD en presencia del sobrenadante de *E. albertii* comparado contra la infección donde se utilizó el patotipo de ECD en ausencia de este sobrenadante. Estos resultados de co-cultivo sugirieron la existencia de metabolitos presentes en el sobrenadante de *E. albertii* que favorecen la actividad proinflamatoria de STEC y EAEC.

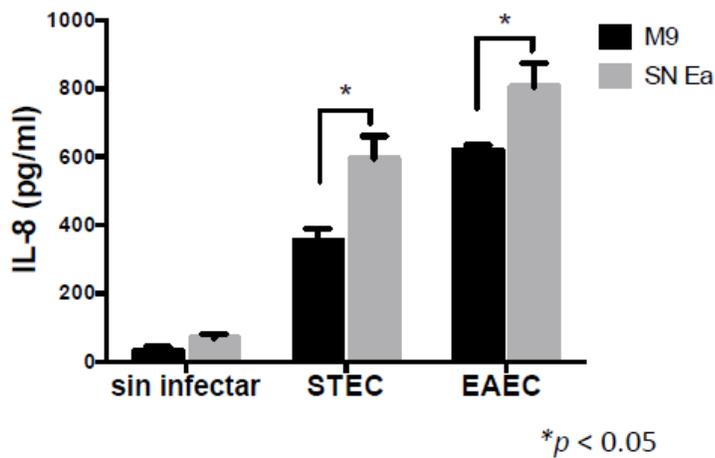


Figura 6. Secreción de IL-8 en células epiteliales intestinales infectadas con STEC y EAEC incubadas con el sobrenadante de *E. albertii*. Cuantificación de la secreción de IL-8 en 6 condiciones; Medio mínimo (M9), sobrenadante *E. albertii*, STEC, STEC+ sobrenadante *E. albertii*, EAEC, EAEC + sobrenadante *E. albertii*.

Con estos antecedentes en el laboratorio se analizó el sobrenadante de *E. albertii* mediante cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas para cuantificar los niveles de SCFA. Estos análisis revelaron la presencia de acetato y formato en el sobrenadante (**Tabla 2**).

Tabla 2. Estudio de metabolómica a sobrenadante de *E. albertii*.

Metabolito	Ácido Acético mM	Ácido Fórmico mM	Ácido Propiónico mM	Ácido Isobutírico mM	Ácido Butírico mM	Ácido Isovalérico mM
Bacteria						
<i>E. albertii</i>	3.61	2.67	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD

<LOD : Bajo el límite de detección

SCFA y patogenicidad

La interacción entre los metabolitos intestinales y los enteropatógenos es un proceso biológico necesario para el desarrollo de la regulación de sus programas metabólicos y expresión génica. (van der Knaap y cols., 2016). Un ejemplo de esta interacción entre metabolitos y el genoma corresponde al efecto de los SCFA existentes en el microambiente intestinal. Los SCFA representan el mayor flujo de carbono de la dieta y son producidos principalmente a partir de la fermentación de carbohidratos no digeribles en el intestino delgado (Miller y cols., 1996). Los SCFA son ácidos alifáticos orgánicos que están compuestos entre uno y seis carbonos, de los cuales el formiato (C1), acetato (C2), propionato (C3) y el butirato (C4) son los más abundantes (95% del total de SCFA intestinales) (Cook y cols., 1998). El acetato, propionato y el butirato se encuentran presentes en aproximadamente una proporción 60:20:20 en colon y deposiciones (Hijova y cols., 2007). Por otro lado, el formiato se encuentra presente solo en íleon a una concentración de 10 mM (Garner y cols., 2009). Dependiendo de la dieta, la concentración total de SCFA se reflejan en una concentración fisiológica desde 20-40 mM en íleon (Lackraj y cols., 2016), 70 mM -140 mM en colon proximal y 20-70 mM en colon distal (Cummings y cols., 1987).

Se ha demostrado que los SCFA regulan la expresión de genes de virulencia en cepas de ECD. Un ejemplo de esto fue descrito por Lackraj y cols., 2016 donde evaluó la regulación de los SCFA en la expresión de genes flagelares de STEC. En otros estudios se ha observado que las cepas de STEC al exponerse a concentraciones elevadas de SCFA, aumentan la expresión de flagelina (*fliC*), los reguladores de transcripción flagelar (*flhC*, *flhD*), genes involucrados en motilidad (*motAB*) y las proteína de quimiotaxis CheA y CheW (Tobe y cols., 2011). Por otro lado, el crecimiento bacteriano bajo condiciones que simulan concentraciones de SCFA presentes en el colon, aumentan la expresión de adhesina en cepas de STEC (Navarro-Garcia, 2014). En

Salmonella, se observó un aumento de la expresión de genes asociados a invasión como también su capacidad de invasión a la línea celular DIV-1 después de haberse expuesto a formato (Gantois y cols., 2006).

Considerando los antecedentes expuestos, este trabajo tuvo como objetivo determinar los cambios en la expresión de factores de virulencia en cepas de STEC y de EAEC inducidos por el acetato y el formato en concentraciones presentes en el sobrenadante de *E. albertii* y en un contexto fisiológico humano. Además, se evaluó la participación los SCFA descritos anteriormente sobre la capacidad de STEC y EAEC de inducir la secreción de IL-8 en células epiteliales intestinales *in vitro*.

Hipótesis

“El acetato, formato y los SCFA a concentraciones fisiológicas humanas inducen un aumento de la expresión de genes involucrados en la virulencia de cepas de STEC y de EAEC, correlacionado con un aumento en la secreción de IL-8 en células epiteliales intestinales *in vitro* infectadas con estos patógenos”

Objetivo General

Determinar el efecto del acetato, formato y los SCFA en concentraciones fisiológicas humanas en la expresión de genes involucrados en la virulencia de STEC y de EAEC, y en la secreción de IL-8 en células epiteliales intestinales mediada por estos patotipos.

Objetivos Específicos

1. Determinar si el acetato o el formato aumenta la expresión de los genes de virulencia *stx2*, *eae* y *lpfA* de STEC y *aggR*, *pet* y *aafA* de EAEC.
2. Determinar si STEC y EAEC en presencia de acetato o formato promueven un aumento en la secreción de IL-8 en células epiteliales intestinales *in vitro*.
3. Determinar si concentraciones fisiológicas humanas de los principales SCFA y el exceso de acetato y formato, aumenta la expresión de los genes de virulencia *stx2*, *eae* y *lpfA* de STEC y *aggR*, *pet* y *aafA* de EAEC.
4. Determinar si STEC y EAEC en presencia de concentraciones fisiológicas de los principales SCFA en colon más un exceso de acetato o formato, inducen un aumento de secreción de IL-8 en células epiteliales intestinales *in vitro*.

Materiales y Métodos

Objetivo específico 1. Determinar si el acetato o el formato aumentan la expresión de los genes de virulencia *stx2*, *eae* y *lpfA* en STEC y *aggR*, *pet* y *aafA* en EAEC.

Cepas bacterianas. Se utilizaron las cepas de referencia de STEC (O157:H7; cepa 86-24) y EAEC (O44:H18; cepa 042). Ambas cepas presentan resistencia a estreptomicina. Las cepas se cultivaron durante la noche en agitación a 180 r.p.m. en medio Luria-Bertani (LB) a 37°C.

SCFA. Se utilizó 5-200 mM acetato de sodio (Sigma-Aldrich) y 2-10 mM formato de sodio. La selección de las concentraciones se realizó en base a la presencia de estos componente en el sobrenadante de *E. albertii* (5-10 mM), concentraciones fisiológicas presentes intestino humano (25 mM-100 mM), y un exceso de acetato sobre los niveles fisiológicos (200 mM). En el caso del formato, las condiciones seleccionadas para realizar los ensayos se eligieron en base a las concentraciones encontradas en el sobrenadante de *E. albertii* (2-5 mM) y las concentraciones fisiológicas encontradas en ileon (10 mM). Como control de osmolaridad se utilizó cloruro de sodio (Sigma-Aldrich) en las mismas concentraciones ya descritas para acetato y formato. Todos los reactivos se prepararon en las concentraciones deseadas con agua destilada y la solución se filtró utilizando un filtro con poros de 0,2 µm de diámetro.

Curvas de crecimiento. Para evaluar el crecimiento bacteriano de STEC y EAEC en presencia del acetato y el formato se siguió el protocolo descrito en la **Figura 7**. Se realizó el crecimiento bacteriano de STEC o EAEC en medio LB durante toda la noche (O/N) en agitación a 180 r.p.m a una temperatura de 37°C (1). Al día siguiente, se realizó una dilución 1:120 del cultivo bacteriano O/N en medio LB y se mantuvo en agitación a 180 r.p.m. y 37°C durante 3 h (2). Seguidamente se realizó una centrifugación de las muestras durante 10 minutos a 5000 r.p.m (3). Se eliminó el sobrenadante y el precipitado bacteriano se resuspendió en medio LB suplementado con el buffer

ácido 3-(N-morfolín) propanosulfónico (MOPS) 100 mM y con concentraciones crecientes de acetato (2-200 mM) o formato (2-10 mM) (4, 5). Como control de osmolaridad, se resuspendió el precipitado bacteriano con concentraciones crecientes de NaCl (2-200 mM). Se agregaron las suspensiones descritas en una placa de 96 pocillos por triplicado (6). Finalmente se procedió a realizar la curva de crecimiento bacteriano cada 1 h en el equipo HT-Synergy (Biotek) durante 12 h mediante la lectura de la densidad óptica (DO) a 630nm (7).

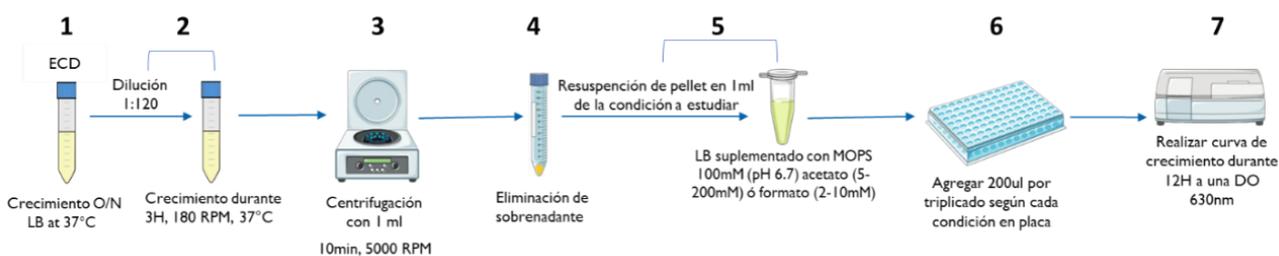


Figura 7. Esquema de realización de curva de crecimiento. Protocolo para realizar curva de crecimiento utilizando ECD en concentraciones de acetato (5-200 mM) y formato (2-20 mM).

Extracción de ARN. Como se observa en la **Figura 8**, para evaluar la expresión de genes en presencia de acetato y formato se realizó la incubación de STEC o EAEC en presencia de LB suplementado con las mismas condiciones de acetato, formato y NaCl durante 3 h. Posteriormente, se centrifugó 1 ml de la suspensión (5.000 r.p.m. durante 10 min) de cada muestra y se eliminó el sobrenadante. Se resuspendió el precipitado bacteriano en 1 ml del reactivo TRIzol™ (Invitrogen) y se extrajo el ARN de acuerdo a las instrucciones del fabricante. El ARN extraído se trató con ADNasa I (Thermo Scientific) para eliminar ADN contaminante y se purificó utilizando el kit RNeasy Mini Elute Cleanup Kit (Qiagen).

Síntesis de ADNc. El ARN obtenido desde las distintas condiciones se utilizó para la síntesis de ADNc utilizando el sistema comercial Transcriptor First Strand cDNA Synthesis (Roche), de acuerdo a las instrucciones del fabricante.

RT-qPCR. El ADNc obtenido se utilizó como template para cuantificar la expresión de los genes *stx2*, *eae* y *lpfA* presentes en STEC y de los genes *aafA*, *aggR*, *pet* de EAEC utilizando los partidores descritos en la **Tabla 3** (Qu y cols., 2016; Betancourt-Sanchez y cols., 2009). La elección de estos genes se realizó debido a su participación en la inducción a la secreción de IL-8 en modelos celulares *in vitro* (Andreoli y cols., 2002; Steiner y cols., 1998; Croxen y cols., 2013). Los datos se normalizaron respecto a un gen de expresión constitutiva, el gen de ARN polimerasa Subunidad A (*rpoA*) y los resultados se analizaron usando el método de Ct comparativo (cuantificación relativa). El perfil de amplificación consistió de un paso de activación por calor a 95°C por 10 min; 40 ciclos de desnaturalización a 95°C por 15 s; alineamiento, extensión y detección de la señal fluorogénica a 60°C por 1 min. Los resultados de expresión de genes de virulencia se presenta como veces de cambio sobre el nivel de expresión de los cultivos de las cepas de STEC y de EAEC en presencia de NaCl.

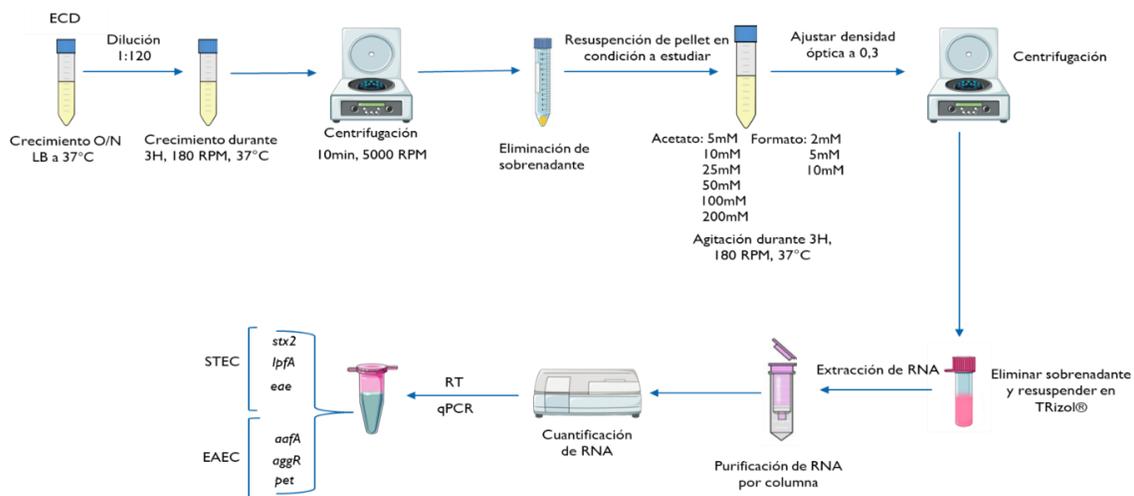


Figura 8. Esquema del procedimiento usado para la evaluación de la expresión génica en cepas de STEC y de EAEC en presencia de acetato y formato.

Tabla 3. Secuencia de partidores para los genes *stx2*, *lpfA*, *eae* de STEC y *aggR*, *aafA*, *pet* de EAEC.

Gen	Secuencia
<i>stx2</i>	F: 5'-GCTGGAATCTGCAACCGTACT-3'
	R: 5'-CACGAATCAGGTTATGCCTCAGT-3'
<i>lpfA</i>	F: 5'-GGCACGGTTAAATTACAGGC-3'
	R: 5'-TGACCCAACACAACCTCCTG-3'
<i>eae</i>	F: 5'-CCGATTCCTCTGGTGACGA-3'
	R: 5'-CCACGGTTTATCAAACCTGATAACG-3'
<i>aggR</i>	F: 5'-CAGGATCGTCAGCAGCTACA-3'
	R: 5'-AAGGATGCCCTGATGATAATATACG-3'
<i>aafA</i>	F: 5'-ACTTCATATAGGCCTGGTCGTA-3'
	R: 5'-ATCACTCTGGCCTCTCCTAGGT-3'
<i>pet</i>	F: 5'-GTGGTGCCTATGCCGTAACC-3'
	R: 5'-CAGCCCCTCTTGTTCCACG-3'

Objetivo específico 2. Determinar si STEC y EAEC en presencia de acetato o formato promueven un aumento en la secreción de IL-8 en células epiteliales intestinales *in vitro*.

Líneas celulares. La línea celular T84, modelo celular comúnmente utilizado para estudiar la patogénesis de *E. coli* (Nataro y cols., 1996), se mantuvo en medio DMEM F12 (Hyclone) suplementado con 10% de suero fetal bovino (SFB; Hyclone), 2,5 mM glutamina y (10 U/ml) penicilina / (10 µg/ml) estreptomicina a 37°C y 5% CO₂.

SCFA. Se seleccionó la menor concentración de acetato y formato donde se obtuvo un aumento sobre las dos veces de cambio en la expresión de los genes evaluados en el objetivo específico 1. La incubación de STEC se realizó con 25 mM acetato y 10 mM formato en ensayos separados junto a su respectivo control. Mientras que en el caso de EAEC se incubó con 100 mM acetato junto a su respectivo control.

Ensayo de secreción de IL-8. Para la realización de este ensayo se siguieron los 4 primeros pasos descritos en la sección de curva de crecimiento. Posteriormente, se resuspendió el precipitado de las cepas de ECD con las condiciones seleccionadas en el objetivo específico 1 y se incubaron por 3 h. Luego se infectó una monocapa de células T84 con las cepas de ECD descritas, utilizando una multiplicidad de infección (MOI) de 10 bacterias por célula. Seguidamente las placas se centrifugaron durante 10 minutos a 1800 r.p.m y se incubaron durante 1 h a 37°C con 5% CO₂.

Después de la infección, los pocillos se lavaron 3 veces con PBS (Hyclone) y se incubaron con 500 µl de medio de cultivo DMEM F/12 suplementado con gentamicina (100 µg/ml), a 37°C por 3 h. Finalmente, se recuperaron los sobrenadantes para la cuantificación de IL-8.

Cuantificación de IL-8. La cuantificación de IL-8 se realizó mediante ELISA siguiendo un protocolo descrito previamente (Harrington y cols., 2005) (**Figura 9**). Se incubó una placa de 96 pocillos con el anticuerpo anti-human IL-8 (BD Biosciences™) diluido 1:500 en buffer Tris 100 mM, pH 8,8 a 4°C durante la noche. La placa se lavó 4 veces con PBS-Tween 0,05% y después se incubó con leche descremada al 5% preparada en PBS por 1 h a 37°C. Después de realizar 3 lavados con PBS-Tween, se agregaron diluciones del estándar de IL-8 (R&D Systems) en duplicado para la realización de la curva de calibración y se agregaron las muestras correspondientes en duplicado, y se incubaron las placas por 4 h a temperatura ambiente. Después, se lavaron los pocillos con PBS-Tween y se agregó el anticuerpo anti-human IL-8 biotinilado de ratón (BD Biosciences™) en dilución 1:2000 y se incubó por 1 h a temperatura ambiente. Posteriormente, la placa se lavó con PBS-Tween y se incubó el conjugado de avidina-HRP (Life Technologies) en dilución de 1:2000, durante 30 minutos a temperatura ambiente. Después de un lavado con PBS-Tween, se agregó la solución sustrato de la enzima HRP 3,3',5,5'-18 tetrametilbencidina (TMB, Promega), cuya reacción genera un producto de color azul. La reacción se detuvo al agregar ácido sulfúrico 2N (H₂SO₄), cambiando a un color amarillo. Finalmente, se realizó la lectura de absorbancia en el equipo HT-Synergy (Biotek) a 450 nm. Las concentraciones de IL-8 se determinaron al interpolar los valores de absorbancia en la curva de calibración de IL-8.

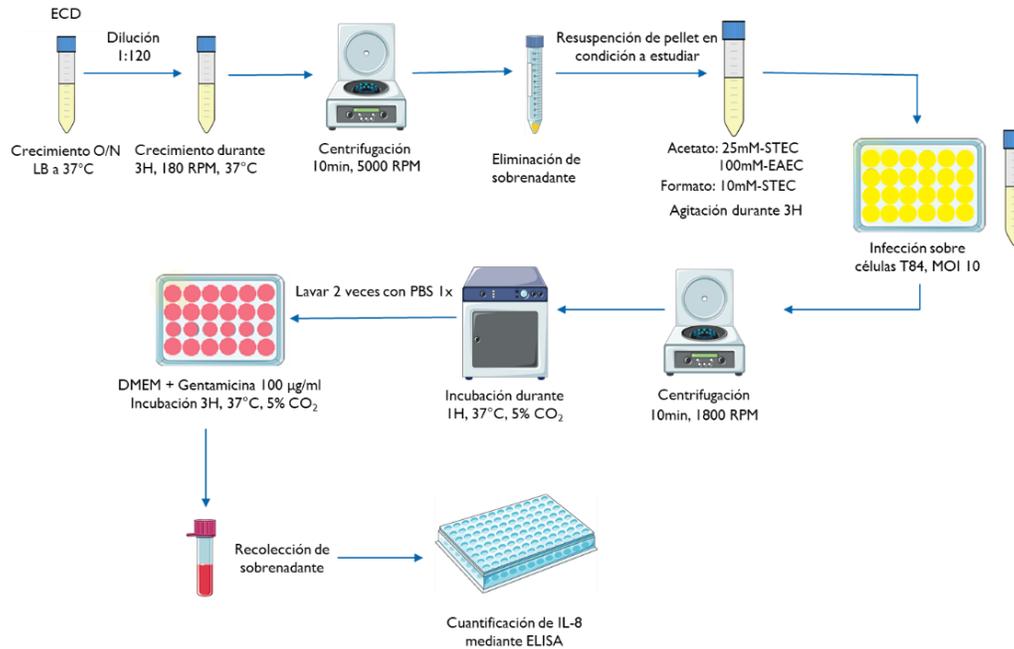


Figura 9. Esquema general de infección con cepas de ECD preincubadas con SCFA.

Objetivo específico 3. Determinar si concentraciones fisiológicas humanas de los principales SCFA y el exceso de acetato y formato, aumenta la expresión de los genes de virulencia *stx2*, *eae* y *lpfA* en STEC y *aggR*, *pet* y *aafa* en EAEC.

Condiciones experimentales. Para la realización de este objetivo se prepararon SCFA en concentraciones fisiológicas presentes en íleon y colon humanas (Cummings y cols., 1987). Las concentraciones de los SCFA utilizadas de íleon fueron: 10 mM formato, 25 mM acetato, 2,5 mM propionato y 2,5 mM butirato y como control de osmolaridad 30 mM NaCl. Por otro lado, las suspensiones utilizadas de SCFA en colon fueron: 95 mM acetato, 60 mM propionato, 17 mM butirato y como control de osmolaridad 172 mM NaCl. De forma adicional se evaluó el efecto que podría generar en la expresión de los genes de STEC y EAEC en estudio un exceso de acetato y formato sobre las condiciones fisiológicas en el colon. Para ello se consideró como exceso las condiciones seleccionadas en el objetivo específico 1, es decir 25 mM acetato y 10 mM formato en el caso de STEC y 100 mM acetato para el caso de EAEC. Como condición control se consideró

un crecimiento de ECD en presencia de SCFA presentes en colon más 35 mM NaCl en el caso de STEC y 100 mM NaCl para EAEC.

Los pasos 1-4 en la curva de crecimiento descrita en el objetivo específico 1. Luego se resuspendió el precipitado bacteriano de STEC y EAEC con concentraciones fisiológicas de SCFA presentes en íleon, colon y exceso de acetato y formato en colon junto a sus respectivos controles, amortiguado con 100 mM MOPS. Se agregaron los medios suplementados mencionados anteriormente en una placa de 96 pocillos por triplicado y se realizó la curva de crecimiento en el equipo HT-Synergy durante 12 h realizando cada hora la lectura de la DO a 630nm.

Para realizar los ensayos de expresión génica el ARN total se aisló a partir de la incubación de STEC o EAEC en presencia de LB amortiguado con MOPS 100 mM y enriquecido en concentraciones de SCFA y NaCl descritas anteriormente (crecidas hasta una DO~0,3). Para los pasos posteriores se continuó con el protocolo de extracción y purificación RNA, síntesis de ADNc, RT-qPCR y normalización descrito en la sección de expresión génica del objetivo específico 1.

Objetivo específico 4. Determinar si STEC y EAEC en presencia de concentraciones fisiológicas de los principales SCFA en colon más un exceso de acetato y formato inducen un aumento de secreción de IL-8 en células epiteliales intestinales *in vitro*.

Se realizaron los pasos 1-4 descritos en el objetivo específico 1, luego se resuspendió el precipitado de las cepas de ECD en los siguientes medios suplementados: En el caso de STEC se utilizó 172 mM SCFA (representativo de colon) y adicionalmente se agregó 25 mM acetato y 10 mM formato. Para EAEC se utilizó 172 mM SCFA más 100 mM acetato. En ambas cepas se utilizó 100 mM MOPS como buffer (**Figura 10**). Se procedió a realizar ensayos de infección con las cepas de ECD y cuantificación de IL-8 como está descrito en objetivo específico 2.

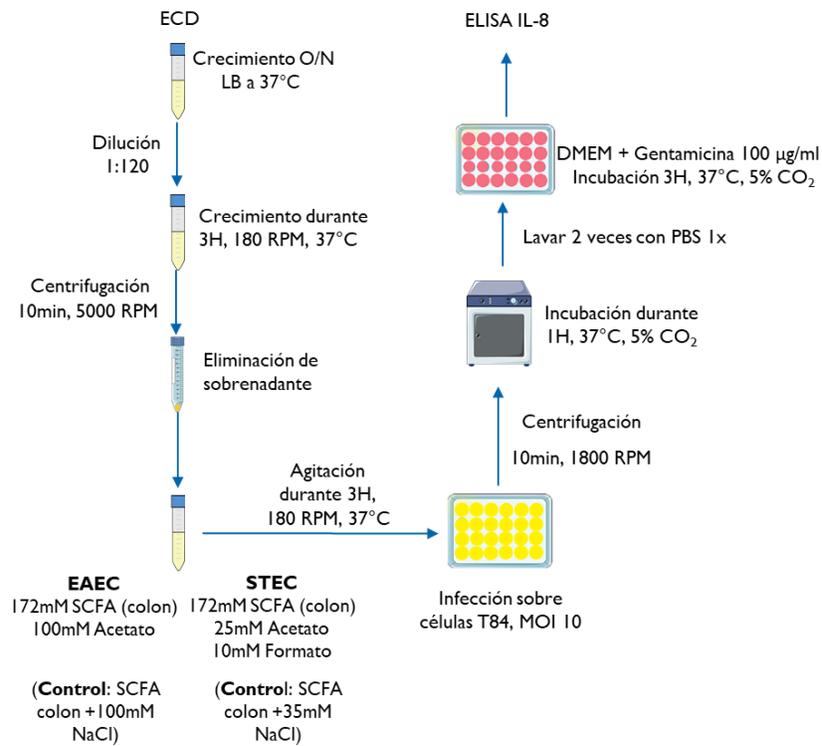


Figura 10. Esquema de infección con cepas de ECD preincubadas con exceso de SCFA fisiológico. La condición seleccionada para STEC fue 172 mM SCFA representativo de colon + 25 mM acetato + 10 mM formato. Para EAEC se utilizó 172 mM SCFA representativo de colon + 100 mM acetato.

Análisis estadístico. Los datos están presentados como el promedio y la desviación estándar del promedio. La significancia se determinó mediante análisis de varianza (ANOVA) de una y dos vías con una prueba *post-hoc* de Dunnet y Sidak según correspondiera. La estadística se analizó usando el software GraphPad Prism 6 (Graphpad Software), considerando un valor $p < 0,01$ como significativo. Las curvas de crecimiento se realizaron en triplicado una vez. Se realizó un ensayo para la evaluación de todos los genes analizados y se hizo un duplicado biológico en las condiciones seleccionadas según correspondía. Para los ensayos de expresión génica, se definió un aumento de 2 veces de cambio como significativo con respecto al control. Para los ensayos de curva de crecimiento e infección se realizaron al menos 3 experimentos independientes para cada condición.

Resultados

Objetivo específico 1: Determinar si el acetato o el formato aumentan la expresión de los genes de virulencia *stx2*, *eae* y *lpfA* en STEC y *aggR*, *pet* y *aafA* en EAEC.

Se estudió como las diferentes concentraciones de acetato y formato pueden afectar el crecimiento de STEC y EAEC. El crecimiento de STEC y EAEC no se ve afectado, con respecto al control, cuando se utilizó acetato en concentraciones de 5-50 mM respectivamente (**Figura 11 A-D, Figura 13 A-D**). Por otro lado, se observó que tanto el crecimiento de STEC como el de EAEC se ve disminuido en presencia de 100 y 200 mM acetato en comparación a su respectivo control de NaCl (**Figura 11 E-F, Figura 13 E-F**) ($p < 0,01$). Para STEC se observó una disminución en el crecimiento desde las 3 horas de incubación y para el caso de EAEC 200 mM acetato desde las 2 h (**Figura 13 F**). De forma adicional, se observó que el formato en todas las concentraciones analizadas no afecta el crecimiento de ambas cepas ECD (**Figura 12, Figura 14**).

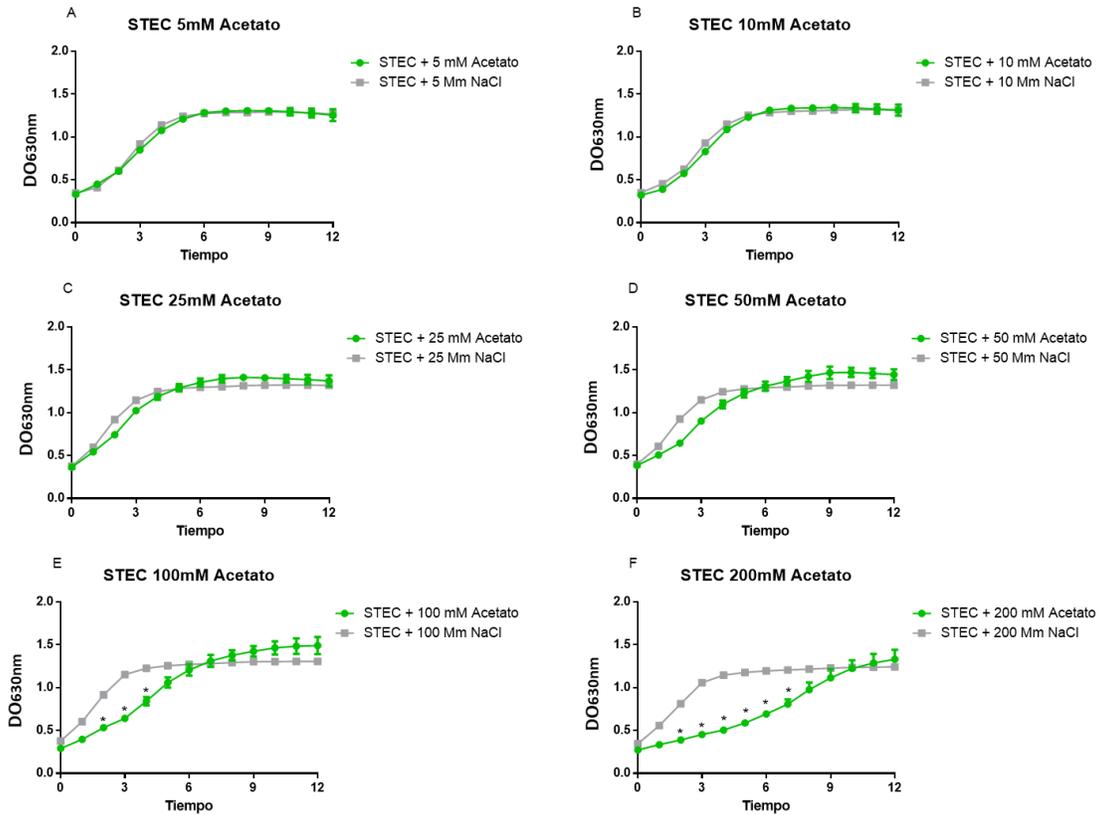


Figura 11. Curva de crecimiento de STEC en presencia de concentraciones crecientes de acetato (5-200 mM) Imágenes representativas de un ensayo. Se realizó 1 experimento independiente por triplicado para cada condición (n= 3). Las barras representan la desviación estándar (triplicado). Test ANOVA de dos vías, seguido de un test *post-hoc* de Sidak. *, p<0,01 entre (E) STEC + 100 mM acetato vs STEC + 100 mM NaCl (F) STEC + 200 mM acetato vs STEC + 200 mM NaCl.

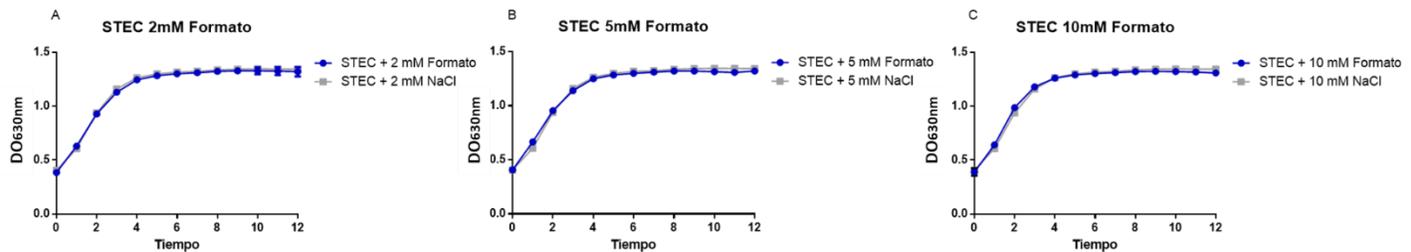


Figura 12. Curva de crecimiento de STEC en presencia de concentraciones crecientes de formato (5-10 mM) Imágenes representativas de un ensayo. Se realizó 1 experimento independiente por triplicado para cada condición (n=3). Las barras representan la desviación estándar (triplicado). Test ANOVA de dos vías, seguido de un test *post-hoc* de Sidak.

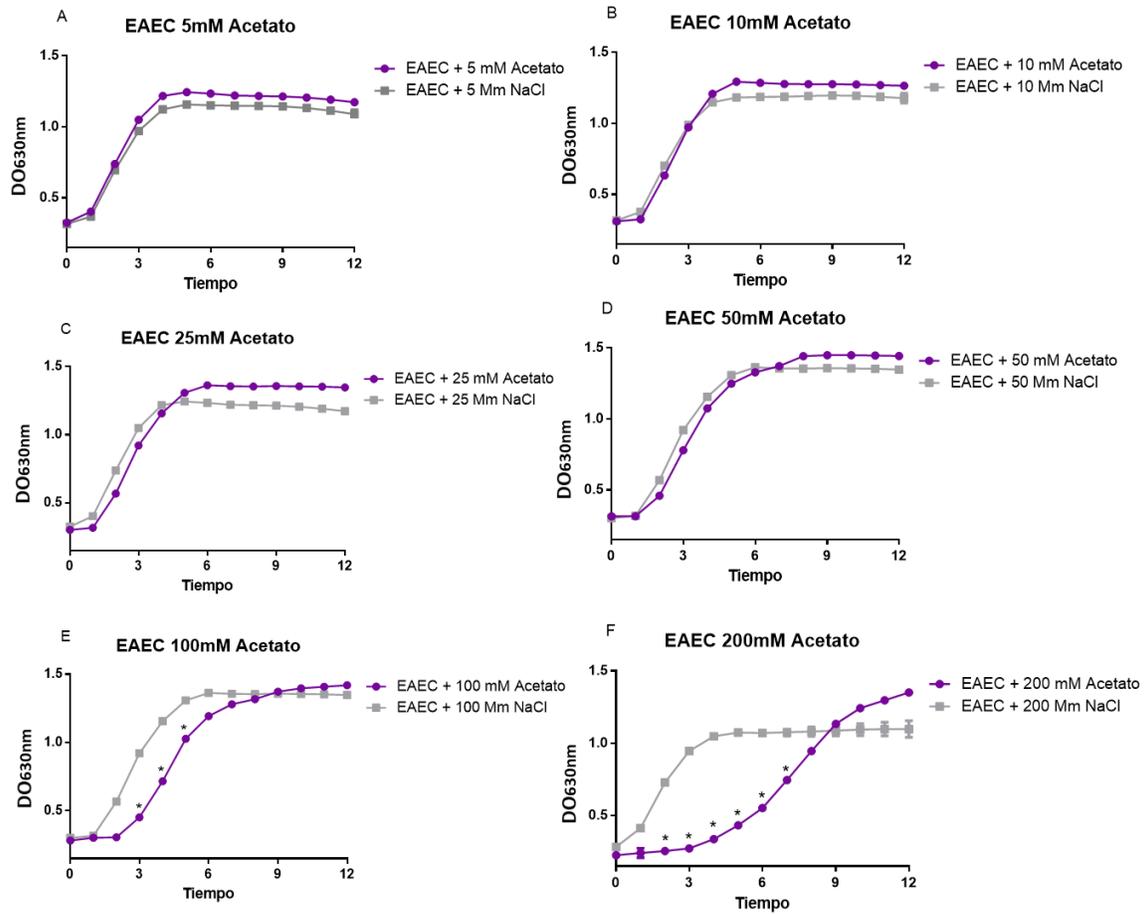


Figura 13. Curva de crecimiento de EAEC en presencia de concentraciones crecientes de acetato (5-200 mM)
 Imágenes representativas de un ensayo. Se realizó 1 experimento independiente por triplicado para cada condición (n=3). Las barras representan la desviación estándar (triplicado). Test ANOVA de dos vías, seguido de un test *post-hoc* de Sidak. *, p<0,01 entre (E) EAEC + 100 mM Acetato vs EAEC + 100 mM NaCl (F) EAEC + 200 mM Acetato vs EAEC + 200 mM NaCl.

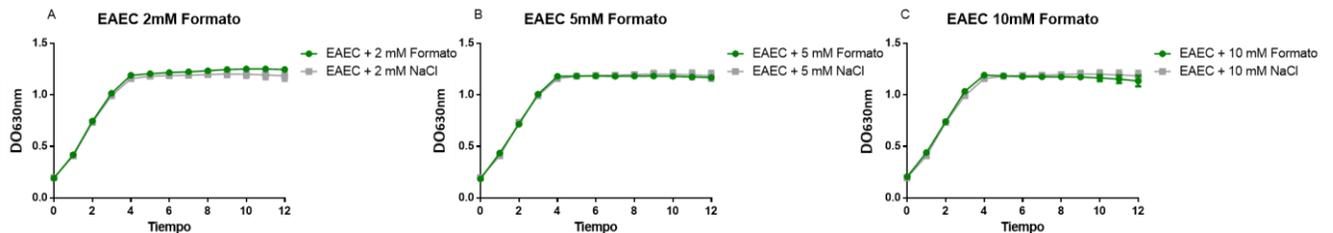


Figura 14. Curva de crecimiento de EAEC en presencia de concentraciones crecientes de formato (5-10 mM)
 Imágenes representativas de un ensayo. Se realizó 1 experimento independiente por triplicado para cada condición (n=3). Las barras representan la desviación estándar (triplicado). Test ANOVA de dos vías, seguido de un test *post-hoc* de Sidak.

En ensayos posteriores se evaluó el rol del acetato y formato sobre la expresión génica de factores de virulencia en STEC (genes *stx2*, *lpfA* y *eae*) y EAEC (genes *aggR*, *aafA* y *pet*), en relación con su control con NaCl. Los resultados obtenidos muestran un aumento de 2,5 veces de cambio del gen *stx2* en presencia de 25 mM acetato y un cambio de 3,6 veces para el gen *eae* al incubar STEC con 10 mM formato (**Figura 15 A**, **Figura 16 A**) respectivamente. En el caso de EAEC, se observó un aumento de 3,2 y 3,6 veces para el gen *pet* en relación al control de NaCl (**Figura 17 A**). Se continuó trabajando con la condición 100 mM acetato, debido a que al aumentar la concentración de acetato a 200 mM se sigue manteniendo la tendencia al aumento de la expresión del gen *pet* relación al control de NaCl, (**Figura 17 A**). No se observó un aumento en la expresión de los genes evaluados en las concentraciones de formato utilizadas (**Figura 18**).

Se procedió a realizar un duplicado biológico para verificar reproducibilidad del ensayo para las condiciones seleccionadas (gen *stx2* a 25 mM acetato y el gen *eae* a 10 mM formato en el caso de STEC y el gen *pet* a 100 mM acetato en el caso de EAEC), y se observó la misma tendencia al aumento sobre 2 veces de cambio (**Figura 15 B**, **Figura 16 B**, **Figura 17 B**). Estos resultados permitieron la elección de las condiciones para ser utilizadas en los objetivos específicos 2 y 4.

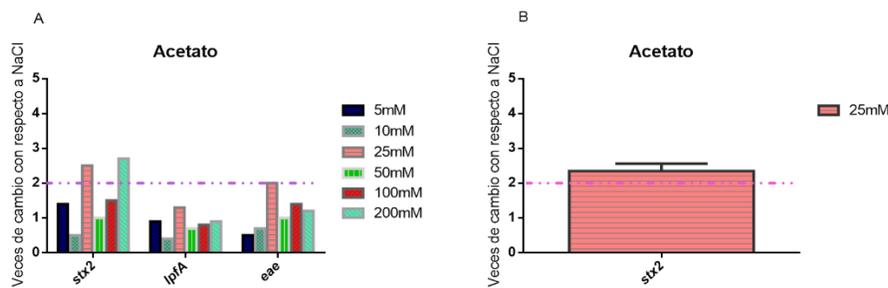


Figura 15. Efecto del acetato sobre la expresión de los genes, *stx2*, *lpfA* y *eae* de STEC. Los efectos del acetato sobre la expresión génica se muestra como de veces de cambio sobre el control NaCl. **(A)** Los resultados mostrados son representativos de un ensayo. **(B)** Replicado biológico de la condición 25 mM acetato para el gen *stx2*.

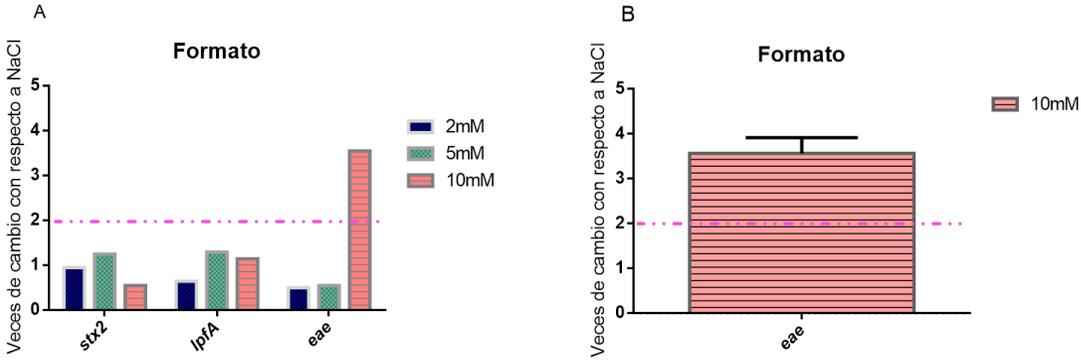


Figura 16. Efecto del formato sobre la expresión de los genes, *stx2*, *lpfA* y *eae* de STEC. Los efectos del formato sobre la expresión génica se muestra como de veces de cambio sobre el control NaCl. (A) Los resultados mostrados son representativos de un ensayo. (B) Replicado biológico de la condición 10 mM formato para el gen *eae*.

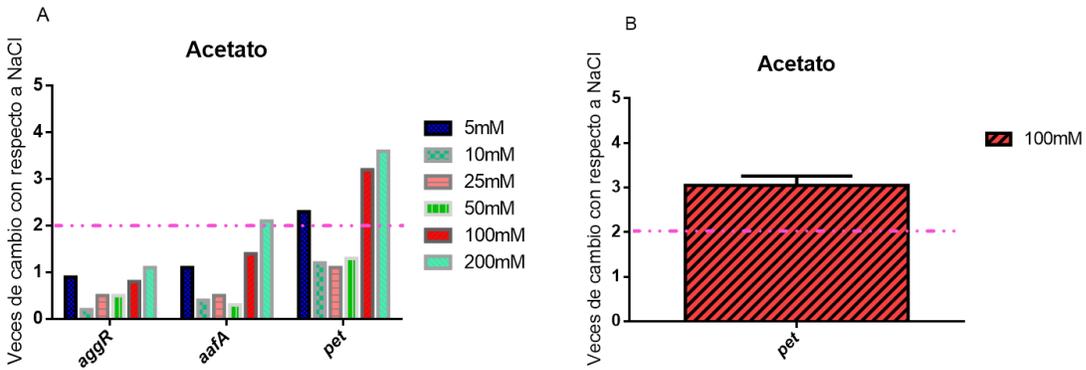


Figura 17. Efecto del acetato sobre la expresión de los genes, *aggr*, *aafA* y *pet* de EAEC. Los efectos del acetato sobre la expresión génica se muestra como de veces de cambio sobre el control NaCl. (A) Los resultados mostrados son representativos de un ensayo. (B) Replicado biológico de la condición 100 mM acetato para el gen *pet*.

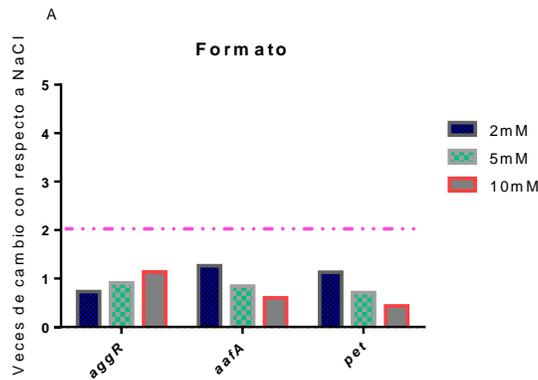


Figura 18. Efecto del formato sobre la expresión de los genes, *aggrR*, *aafA* y *pet* de EAEC. Los efectos del formato sobre la expresión génica se muestra como de veces de cambio sobre el control NaCl.

Objetivo específico 2: Determinar si STEC y EAEC en presencia de acetato o formato promueven un aumento en la secreción de IL-8 en células epiteliales intestinales in vitro.

Con el fin de evaluar el rol del acetato y el formato en la inducción de la secreción de IL-8 mediada por STEC y EAEC sobre células epiteliales intestinales, se infectó una monocapa de células T84 con estas cepas de ECD. Previo a la infección, las cepas ECD se incubaron con un medio suplementado con 25 mM acetato y 10 mM formato en el caso de STEC y 100 mM acetato en el caso de EAEC, considerando las condiciones descritas en la sección de materiales y métodos del objetivo específico 2. Observamos que las cepas de STEC y de EAEC incubadas presencia de SCFA no presentan diferencias significativas en la inducción de la secreción de IL-8 en comparación a la infección con la cepa ECD incubadas en concentración equivalente de NaCl (Figura 19-20 A y B).

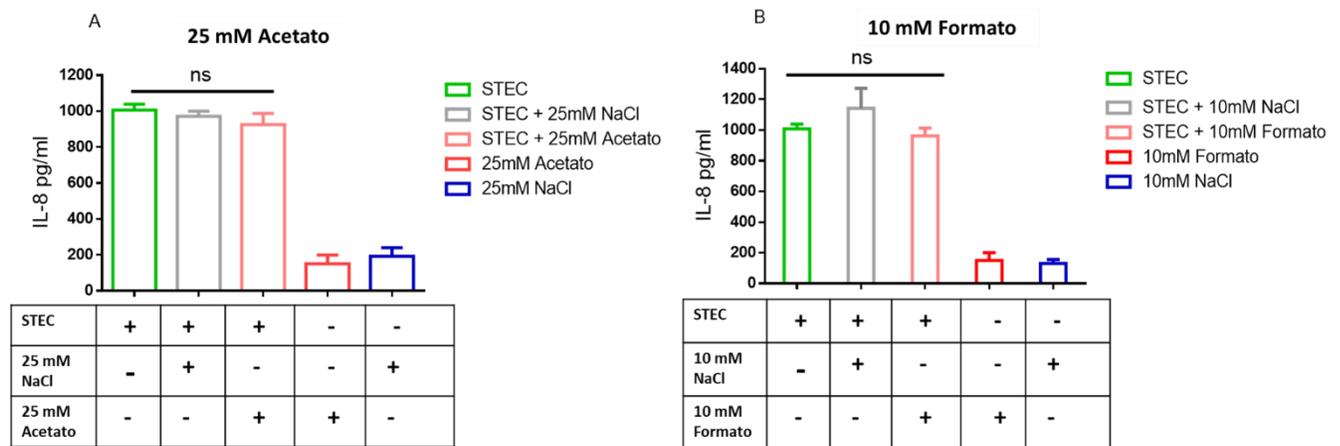


Figura 19. Secreción de IL-8 en células epiteliales intestinales infectadas con una cepa de STEC incubadas con acetato y formato. Cuantificación de la secreción de IL-8 en 5 condiciones: (A) STEC (solo bacteria), STEC + 25 mM NaCl, STEC + 25 mM acetato, 25 mM acetato, 25 mM NaCl. (B) STEC (solo bacteria), STEC + 10 mM NaCl, STEC + 10 mM formato, 10 mM formato, 10 mM NaCl. Los resultados mostrados son representativos de 3 repeticiones y se muestran como el promedio de un triplicado biológico. Test ANOVA de una vía, seguido de un test *post-hoc* de Dunnet. ns, no significativo.

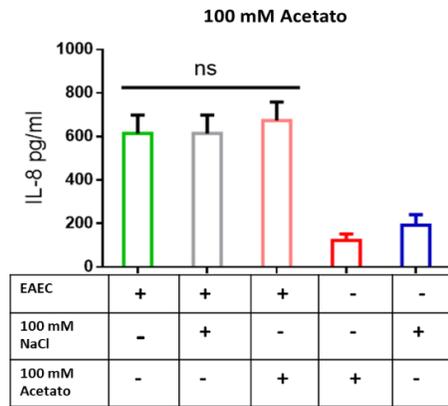


Figura 20. Secreción de IL-8 en células epiteliales intestinales infectadas con una cepa de EAEC incubadas con acetato. Imágenes representativas de un ensayo (n=3). Cuantificación de la secreción de IL-8 en 5 condiciones: (A) EAEC (solo bacteria), EAEC + 100 mM NaCl, EAEC + 100 mM acetato, 100 mM acetato, 100 mM NaCl. Los resultados mostrados son representativos de 3 repeticiones y se muestran como el promedio de un triplicado biológico. Test ANOVA de una vía, seguido de una prueba *post-hoc* de Dunnett. ns, no significativo.

Objetivo específico 3: Determinar si concentraciones fisiológicas humanas de los principales SCFA y el exceso de acetato y formato, aumenta la expresión de los genes de virulencia *stx2*, *eae* y *lpfA* (STEC) y *aggR*, *pet* y *aafA* (EAEC).

Se estudiaron cómo las diferentes concentraciones de SCFA presentes en íleon y colon afectan el crecimiento de STEC y EAEC. No se observó diferencia significativa en el crecimiento de STEC y EAEC incubadas en las condiciones de SCFA presentes en íleon con respecto al control de 30 mM NaCl (**Figura 21-22 A**). En cambio, tanto el crecimiento de STEC como de EAEC se ve disminuido en la condición de SCFA presentes en colon con respecto a la incubación con NaCl 172 mM ($p < 0,01$), entre las 2-4 h en STEC (**Figura 21 B**) y entre 1 y 5 h en el caso de EAEC (**Figura 22 B**).

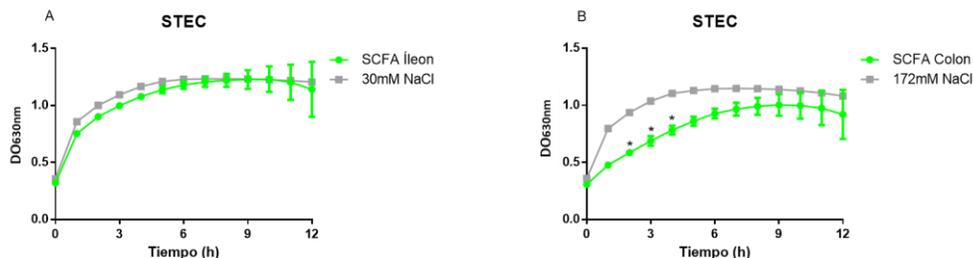


Figura 21. Curva de crecimiento de STEC en presencia de concentraciones de SCFA presentes en íleon y colon humanos. Imágenes representativas de un ensayo. Se realizó 1 experimento independiente para cada condición (n=3). Las barras representan la desviación estándar (triplicado). Test ANOVA de dos vías, seguido de un test *post-hoc* de Sidak. *, $p < 0,01$ entre (B) SCFA Colon vs 172 mM NaCl.

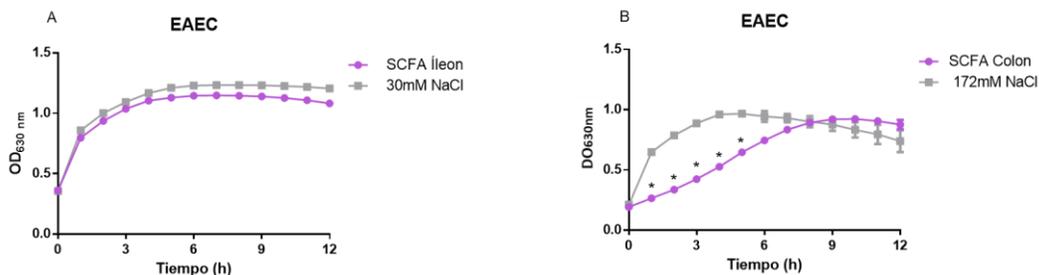


Figura 22. Curva de crecimiento de EAEC en presencia de concentraciones de SCFA presentes en íleon y colon humanos. Imágenes representativas de un ensayo. Se realizó 1 experimento independiente para cada condición (n=3). Las barras representan la desviación estándar (triplicado). Test ANOVA de dos vías, seguido de un test *post-hoc* de Sidak. *, $p < 0,01$ entre (B) SCFA Colon vs 172 mM NaCl.

Seguidamente se evaluó el rol de los SCFA presentes en íleon y colon sobre la expresión génica de factores de virulencia en STEC y EAEC. Para dar cumplimiento con esta actividad, se siguió el protocolo descrito del objetivo específico 3. Los resultados obtenidos con STEC en presencia de SCFA en el colon muestran un aumento de 2,6 y 2,1 veces de cambio en relación al control para los genes que codifican la toxina Shiga e intimina (genes *stx2* y *eae* respectivamente) (**Figura 23 A**). En el caso de EAEC, se observó un aumento de 4, 3 y 10 veces de cambio en relación al control para los genes que codifican AggR, AafA y Pet (genes *aggR*, *aafA* y *pet*, respectivamente) (**Figura 23 B**).

En ensayos posteriores, se evaluó cual podría ser el efecto que genera un exceso de acetato y formiato sobre los valores fisiológicos de SCFA en el colon humanos en la expresión génica de factores de virulencia en cepas de STEC y EAEC. Para esto se expuso a las cepas de ECD en concentraciones de SCFA presentes en colon adicionando acetato o formiato de acuerdo a las condiciones seleccionadas en el objetivo específico 1; 25 mM acetato y 10 mM formiato para STEC y 100 mM acetato para EAEC. En los resultados obtenidos de expresión génica con ambas bacterias no se observó un aumento significativo con respecto al control para todos los genes evaluados (**Figura 24 A y B**).

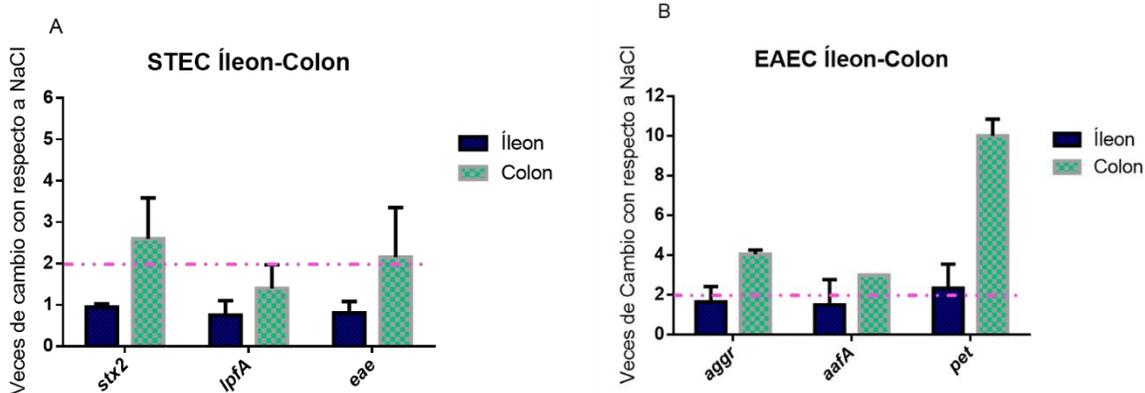


Figura 23. Efecto de los SCFA fisiológicos en íleon y colon humano sobre la expresión de los genes, *stx2*, *lpfA*, *eae* en STEC y *aggr*, *aafA*, *pet* en EAEC. Los efectos de los SCFA sobre la expresión génica se muestra como veces de cambio sobre el control NaCl. La condición de SCFA presente en colon se consideró para el objetivo específico 4. Los resultados mostrados en la figura A y B son representativos de dos ensayos.

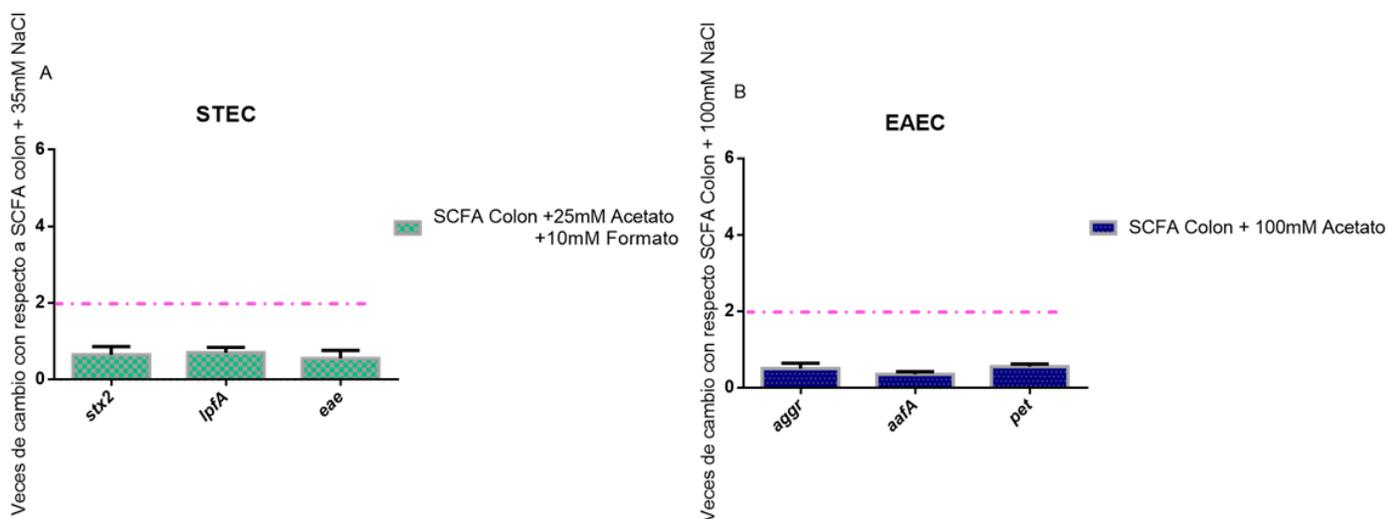


Figura 24. Efecto del exceso de acetato y formato sobre valores fisiológicos de SCFA en íleon y colon sobre la expresión de los genes de virulencia de STEC y EAEC. Los efectos de los SCFA sobre la expresión génica se muestra como veces de cambio sobre el control NaCl. La concentración de SCFA presente en colon se consideró para el objetivo específico 4. Los resultados mostrados en A y B son representativos de dos ensayos.

Objetivo específico 4: Determinar si STEC y EAEC en presencia de concentraciones fisiológicas de los principales SCFA en colon más un exceso de acetato o formato, inducen un aumento de secreción de IL-8 en células epiteliales intestinales in vitro.

En este objetivo se evaluó como el exceso de acetato y formato sobre los valores fisiológico de SCFA humanos participaba sobre la capacidad de STEC y EAEC de inducir secreción de IL-8 por células epiteliales intestinales *in vitro*. La incubación e infección sobre células T84 se realizó con un medio suplementado considerando las condiciones descritas en la sección de materiales y métodos del objetivo específico 4. Ambas cepas en presencia de exceso de SCFA no presentan diferencias significativas en la secreción de IL-8 en comparación a la ECD en presencia de NaCl (Figura 25 A y B).

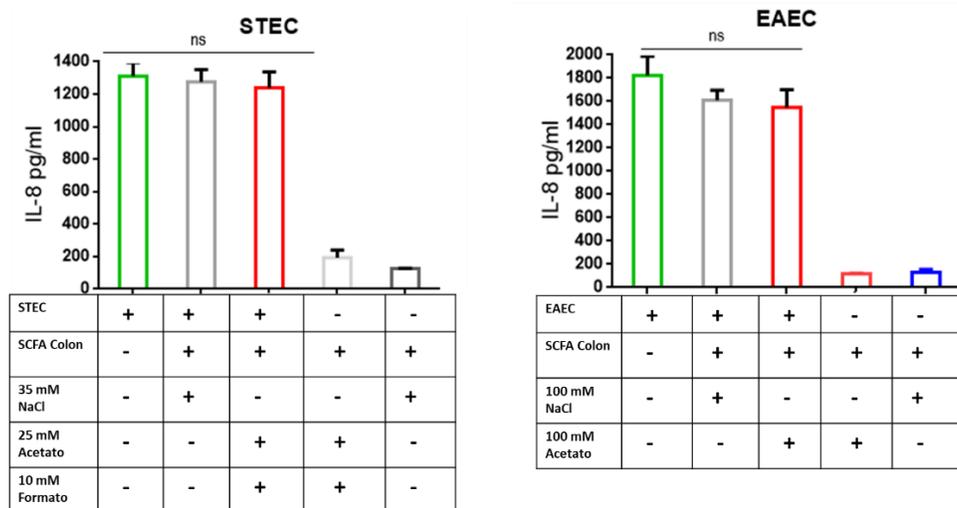


Figura 25. Secreción de IL-8 en células epiteliales intestinales infectadas con la cepa de STEC y de EAEC incubadas con exceso de SCFA. Imágenes representativas de un ensayo (n=3). Cuantificación de la secreción de IL-8 en 5 condiciones: (A) STEC (solo bacteria), STEC + SCFA Colon + 35mM NaCl, STEC + SCFA Colon + 25 mM acetato + 10 mM formato, SCFA Colon + 25 mM acetato + 10 mM formato, SCFA Colon + NaCl 35mM. (B) EAEC (solo bacteria), EAEC + SCFA Colon + 100 mM NaCl, EAEC + SCFA Colon + 100 mM acetato, SCFA Colon + 100 mM acetato, SCFA Colon + 100mM NaCl. Los resultados mostrados son representativos de 3 repeticiones y se muestran como el promedio de un triplicado biológico. Test ANOVA de una vía, seguido de un test *post-hoc* de Dunnet. ns, no significativo.

Discusión

Diversos estudios han demostrado que los SCFA participan en procesos de infección de patógenos entéricos (Yang y cols., 2018; Yang y cols., 2018; Herold y cols., 2009). Resultados preliminares obtenidos en nuestro laboratorio sugieren la existencia de metabolitos en el sobrenadante de una bacteria de la microbiota, *E. albertii*, que estaría participando en la patogenicidad de STEC y EAEC. Bajo ese argumento se realizó un análisis de metabolómica en el sobrenadante de *E. albertii*, el cual reveló la presencia de acetato y formato (**Tabla 2**). La interacción entre los SCFA y las cepas de ECD aún no ha sido completamente determinado y fue el motivo principal de esta investigación.

En este trabajo de tesis se evaluó el efecto que distintas concentraciones de acetato, formato y SCFA en un contexto fisiológico humano podrían tener sobre la expresión génica de STEC y EAEC, además de la capacidad de inducción de una respuesta inflamatoria que podrían ejercer estos patógenos sobre células epiteliales intestinales *in vitro*. De la misma manera se evaluó el rol de STEC y EAEC en presencia de exceso de acetato y formato sobre los niveles de SCFA fisiológicos humanos en la inducción de respuesta inflamatoria sobre células T84.

Las curvas de crecimiento revelaron que el acetato a concentraciones mayores a 100 mM y los SCFA a concentraciones presentes en colon retrasan significativamente el crecimiento de la bacteria en comparación a su control de osmolaridad (**Figura 11 E-F, Figura13 E-F**). Una posible explicación para este resultado podría asociarse al transporte del acetato mediante acetato la permeasa (ActP) (Sa-Pessoa y cols., 2013). Este transporte genera un aumento a en el pH intracelular debido a la acumulación de acetato en su forma ionizada en el interior de la célula. Por lo tanto, para mantener el pH intracelular bacteriano cerca de 6,7, es necesario la liberación de

protones, y eso genera gasto de energía y por ende podría afectar el crecimiento bacteriano (Axe y cols., 1995). Se ha descrito también que el acetato en su forma ácida (encontrada en menor proporción en intestino humano) es liposoluble, de manera que puede penetrar la membrana bacteriana sin necesidad de un transportador. Adicionalmente, la presencia de acetato en el citoplasma bacteriano incrementa la presión osmótica intracelular y para mantener la presión osmótica intracelular se genera una reducción de aniones como el glutamato, acción que podría afectar el metabolismo, y por ende, el crecimiento bacteriano (Valgepea y cols., 2010). Por otro lado, el formato en las concentraciones utilizadas no tuvo efecto en el crecimiento de las cepas de ECD evaluadas. Esto podría deberse a que los enteropatógenos previenen la acidificación que genera el formato en el citoplasma bacteriano mediante un canal de formato (FocA), facilitando el transporte bidireccional del formato desde el espacio extracelular hacia el periplasma, donde la enzima formato deshidrogenasa (FDH) cambia el formato a dióxido de carbono hacia el exterior de la célula (Waight y cols., 2010).

Al evaluar la participación del acetato y el formato sobre la expresión génica de STEC y EAEC, se encontró que el acetato a 25 mM y 100 mM aumenta la expresión de los genes que codifican la toxina Shiga en STEC y Pet en EAEC (**Figura 15 y 17**). Por otro lado, el formato a 10 mM aumenta la expresión del gen que codifica para intimina en STEC (**Figura 16**).

Las enterobacterias al realizar su tránsito por el tracto gastrointestinal GI se exponen a distintas concentraciones de SCFA. Los resultados obtenidos demuestran que STEC y EAEC utilizan estos cambios en concentración de SCFA para la modulación de la expresión de sus factores de virulencia. En relación al gen *stx2*, su expresión podría estar ocurriendo durante el tránsito inicial de la bacteria a través del intestino donde las concentraciones de acetato se encuentran entre 10-30 mM, lo que concuerda con resultados publicados (Lackraj y cols., 2016; Mohawk y cols., 2010).

Otros estudios también respaldan la participación del acetato y le atribuyen una función de “señal intestinal” para inducir la expresión factores asociados a la motilidad y adherencia en enteropatógenos, procesos indispensables para generar daño en el hospedero (Yang y cols., 2018). En relación a Pet, esta proteína pertenece a la familia de proteínas serin proteasa autotransportadoras (SPATE, pero no se conoce con certeza los mecanismos que regulan su expresión. Se ha observado que hay factores presentes en el intestino como la presencia de pH alcalino (6,7-7 en colon) o de ciertos aminoácidos que podrían estar involucrados en la activación de estas proteínas autotransportadora (Dautin, 2010; Betancourt-Sanchez y cols., 2009).

El formato participa como señal de inducción del gen *eae* en STEC, tal como sucede en *Salmonella*, donde se ha observado que la expresión de factores asociados a la colonización en intestino (como T3SS) se ven aumentados cuando la bacteria se expone a concentraciones de 10 mM formato (Huang y cols., 2008). En otros estudios se ha observado que enteropatógenos con mutaciones en vías metabólicas asociadas a la producción de formato como acetato sintasa fosfato acetil-transferasa (*ackA-pta*) de igual manera expresan factores de virulencia en comparación a enteropatógenos sin mutaciones en estas vías, indicando que el formato extracelular actúa como una señal y podría estar modulando la virulencia (Lawhon y cols., 2002). Otro estudio reveló que STEC mantuvo niveles de expresión elevados para el gen *eae* en condiciones representativas de íleon en menores de 3 años, indicando que STEC aumenta la expresión de intimina antes de llegar al colon y tener contacto con células epiteliales en ese sitio (Roussel y cols., 2016).

Al evaluar el efecto de los SCFA en contexto fisiológico humano sobre la expresión génica de los factores de virulencia de STEC y EAEC, observamos que particularmente el colon, fisiológicamente más rico en SCFA, induce un aumento de 2 veces en la expresión génica con

respecto al control de NaCl de la mayoría de los genes evaluados (**Figura 23 A y B**). Esta característica no se observó en concentraciones de SCFA presentes en íleon ni en concentraciones donde se utilizó un exceso de SCFA (**Figura 23 A y B**). Siendo estos resultados consistentes con la evidencia que el colon es el sitio de colonización de STEC y EAEC (Paton y cols., 1998). Es importante resaltar que el formato se encuentra en concentraciones indetectables en colon, sitio de infección para STEC y EAEC en humanos. Nuestros resultados en el análisis del sobrenadante de *E. albertii* indicaron la presencia de formato. Este hallazgo podría indicar que *E. albertii* aporta concentraciones de formato en pacientes con infecciones por ECD y como resultado se promueve la virulencia en STEC.

Una de las limitaciones de nuestros resultados se refiere a que en la mayoría de los ensayos solo se realizaron duplicados biológicos en los genes que cumplieran con el criterio de selección propuesto, y se hizo un solo ensayo exploratorio con todas las condiciones y genes evaluados. Debido a esto la realización de técnicas complementarias como el Western Blot o inmunofluorescencia serán útiles para evaluar si existen cambios a nivel de proteína de los genes evaluados y respaldar los resultados obtenidos en los ensayos IL-8, donde no se observó diferencia significativa en la secreción de IL-8 en comparación al control de NaCl. En relación a los ensayos de secreción de IL-8, se seleccionó 1 h para la infección debido al lento crecimiento bacteriano en los SCFA en comparación al NaCl. El criterio de selección de 3 h de exposición de STEC y EAEC a los SCFA se consideró debido a que durante las 3 h de crecimiento la bacteria alcanza la fase logarítmica de crecimiento, etapa donde está descrita la expresión de los factores de virulencia evaluados en *E. coli* (Pletnev y cols., 2015). Es importante indicar que el daño en las células intestinales en cultivo inducido por las cepas de ECD en los ensayos de infección no fue evaluado.

Considerando que los factores de virulencia estudiados inducen daño celular, sería importante evaluar la viabilidad de las células T84, posterior a la infección con ECD.

También es importante mantener en consideración el efecto que ejerce el medio de cultivo utilizado en la bacteria sobre la expresión génica de esta misma, ya que, en los ensayos realizados, la bacteria se expuso a los medios LB y DMEM-F12. Al cambiar el ambiente de crecimiento, *E. coli* debe adaptarse debido a diferente disposición de nutrientes, cambio en pH, temperatura, disponibilidad de agua, oxígeno y osmolaridad que podrían participar en cambios metabólicos que representen un factor para la modulación proteómica de la bacteria (Bhagwat y cols., 2005; Müsken y cols., 2008), cambio que podría ocurrir en los ensayos realizados. Con respecto al modelo celular utilizado, es importante tener en cuenta que las células T84 no presentan el receptor Gb3 para la unión de la toxina Shiga (Schüller y cols., 2004). Esto explicaría por que el aumento en la expresión del gen *stx2* no se traduce a mayor secreción de IL-8 con respecto al control utilizado. Otra explicación para que el aumento en la expresión génica no se traduzca en un aumento en la secreción de IL-8 podría deberse a que la bacteria exhibe expresión de ciertos factores asociados a la virulencia mientras se encuentra en agitación en comparación al estar en estado estático, un escenario que ocurre al incubar la bacteria a 5% CO₂ en el ensayo de infección con las células T84 (Lackraj y cols., 2016).

Para llevar a cabo la infección, las cepas de ECD no solo debe sobrevivir en el tracto gastrointestinal, sino también debe coordinar la expresión de factores de virulencia determinantes en respuesta al microambiente intestinal. Se ha demostrado que ECD puede adaptarse a varios factores del ambiente presentes en el intestino, que involucran aspectos químicos, hormonales, mecánicos y biológicos que influyen en la supervivencia y virulencia del patógeno (Thevenot y cols., 2013). Una gran parte de los genes asociados a la virulencia son modulados por una o varias

de estas señales ambientales. Los modelos utilizados en este estudio son útiles para evaluar aspectos puntuales, pero al llevarlo a un contexto fisiológico humano pueden demostrar inconsistencias. Es por esto que la integración de un modelo que se asemeje a las condiciones intestinales podría darnos una visión más real de los cambios que ECD experimenta en el intestino humano. La integración de un modelo que regule niveles de pH mantenga una dinámica digestiva, genere simulación de secreción de sales biliares y mantenga una microbiota de origen humano, son sin lugar a duda parámetros claves requeridos para fortalecer las observaciones descritas en este estudio.

De acuerdo a los resultados obtenidos en este trabajo, se propone un modelo (**Figura 26 y 27**), que esquematiza una infección por STEC y EAEC en condiciones intestinales in vitro en ausencia y presencia de SCFA fisiológicas humanas. Se resalta que los SCFA a distintas concentraciones pueden modular la expresión de los genes involucrados en la virulencia en STEC y EAEC. Sin embargo, no se observó un cambio en la inducción a la secreción de IL-8. El aumento en la expresión de los genes *stx2* y *eae* a concentraciones de SCFA presentes en el colon podrían indicar que los SCFA actúan como una señal para inducir un aumento en la adherencia de STEC en el colon humano, estableciendo allí su sitio de colonización, acompañado de la secreción de la toxina Shiga. Un escenario similar estaría ocurriendo en EAEC, que al llegar al colon aumenta la expresión de AggR, la fimbria AAF y secretando toxina Pet, favoreciendo así la colonización a los enterocitos presentes en el colon humano.

Modelo de resultados

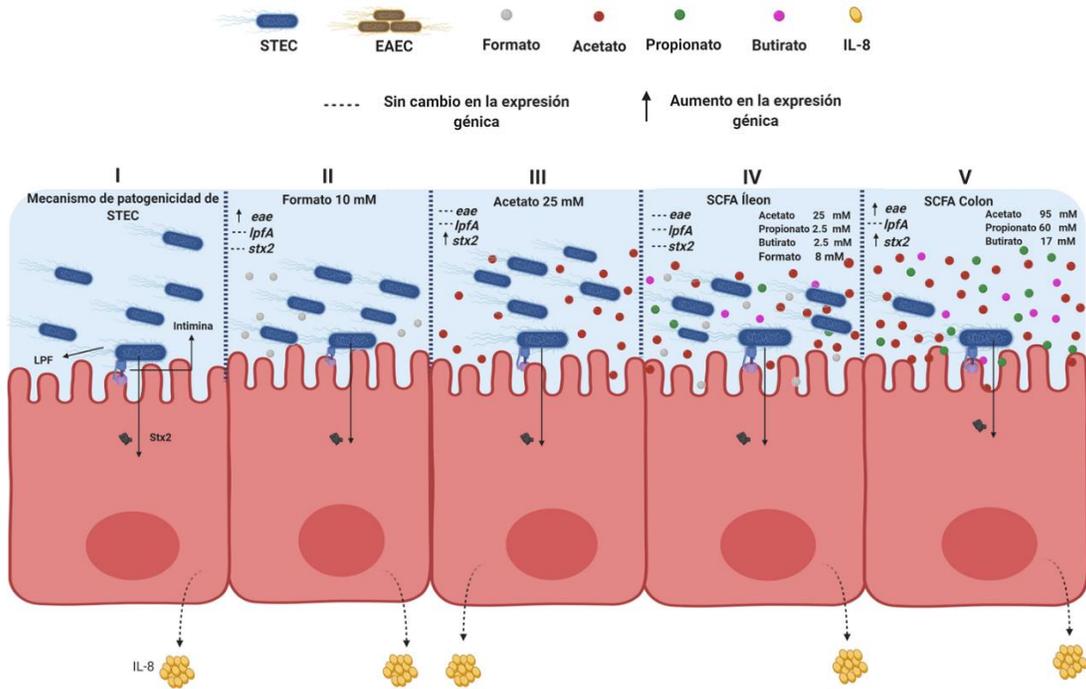


Figura 26. Modelo de resultados para STEC 86-24. I- Participación de LPF, Intimina y Stx2 en la patogenicidad de STEC. II- Aumento en la expresión génica de *eae* en presencia de 10 mM formato. III- Aumento en la expresión génica de *stx2* en presencia de 25 mM acetato. IV- Expresión basal en los genes *stx2*, *lpfA* y *eae* en concentraciones de SCFA presentes en íleon. V- Aumento en la expresión génica de *eae* y *stx2* en presencia de SCFA a concentraciones presentes en el colon humano y disminución en el crecimiento de STEC. Misma tendencia en la secreción de IL-8 en todas condiciones evaluadas en STEC.

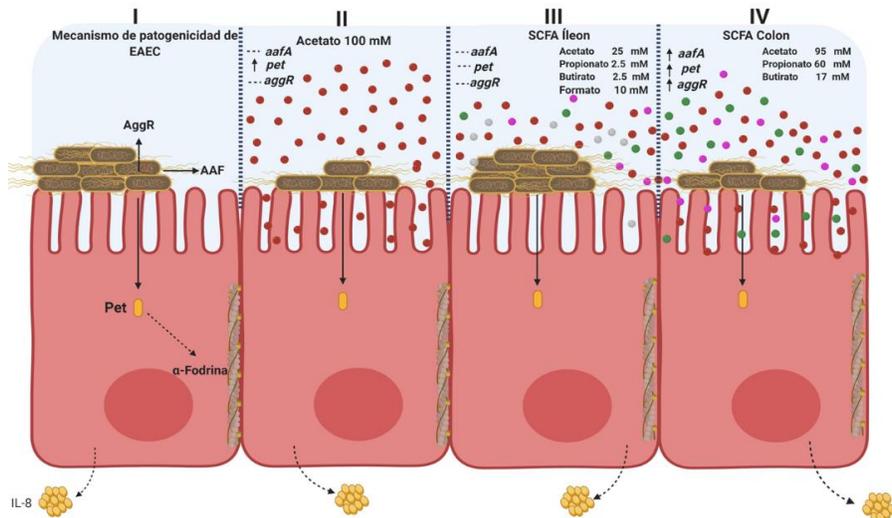


Figura 27. Modelo de resultados para EAEC 042. I Participación de AggR, AAF y la toxina Pet en la patogenicidad de EAEC. II- Aumento en la expresión de *pet* en presencia de acetato 100 mM y disminución en el crecimiento de EAEC. III- Expresión basal de los genes *pet*, *aafA* y *aggR* en concentraciones SCFA de íleon humano. IV Aumento de los genes *aggR*, *aafA* y *pet* en concentraciones de SCFA presentes en el colon humanos y disminución en el crecimiento de EAEC. Misma tendencia en la secreción de IL-8 en todas condiciones evaluadas en EAEC

Conclusiones

- El formato y el acetato a concentraciones de 10 y 25 mM aumentan la expresión génica de *stx2* y *eae* en STEC 86-24, mientras que el acetato a concentraciones de 100 mM aumenta la expresión génica de *pet* en EAEC 042.
- El formato a 10 mM y el acetato a 25-100 mM, no aumenta la capacidad de STEC 84-24 y EAEC 042 de inducir secreción de IL-8 sobre células T84 en los ensayos de infección en el modelo utilizado.
- Los SCFA a concentraciones fisiológicas en el colon aumentan la expresión génica de *stx2*, *eae* en STEC 86-24 y *aggR*, *aafA* y *pet* en EAEC 042.
- El exceso de acetato y formato sobre condiciones fisiológicas de SCFA en colon no aumenta la capacidad de STEC 86-24 y EAEC 042 de inducir secreción de IL-8 sobre células T84 en los ensayos de infección en el modelo utilizado.

Bibliografía

- Andreoli, S. P., Trachtman, H., Acheson, D. W. K., Siegler, R. L., & Obrig, T. G. (2002). Hemolytic uremic syndrome: epidemiology, pathophysiology, and therapy. *Pediatric nephrology (Berlin, Germany)*, 17(4), 293-298.
- Axe, D. D., & Bailey, J. E. (1995). Transport of lactate and acetate through the energized cytoplasmic membrane of *Escherichia coli*. *Biotechnology and bioengineering*, 47(1), 8-19.
- Bäumler, A. J., & Sperandio, V. (2016). Interactions between the microbiota and pathogenic bacteria in the gut. *Nature*, 535(7610), 85-93.
- Bengmark, S. (1998). Ecological control of the gastrointestinal tract. The role of probiotic flora. *Gut*, 42(1), 2-7.
- Betancourt-Sanchez, M., & Navarro-Garcia, F. (2009). Pet secretion, internalization and induction of cell death during infection of epithelial cells by enteroaggregative *Escherichia coli*. *Microbiology (Reading, England)*, 155(Pt 9), 2895-2906.
- Bhagwat, A. A., Chan, L., Han, R., Tan, J., Kothary, M., Jean-Gilles, J., & Tall, B. D. (2005). Characterization of enterohemorrhagic *Escherichia coli* strains based on acid resistance phenotypes. *Infection and immunity*, 73(8), 4993-5003.
- Cook, S. I., & Sellin, J. H. (1998). Review article: short chain fatty acids in health and disease. *Alimentary pharmacology & therapeutics*, 12(6), 499-507.
- Croxen, M. A., Law, R. J., Scholz, R., Keeney, K. M., Wlodarska, M., & Finlay, B. B. (2013). Recent advances in understanding enteric pathogenic *Escherichia coli*. *Clin Microbiol Rev*, 26(4), 822-880.
- Cummings, J. H., Pomare, E. W., Branch, W. J., Naylor, C. P., & Macfarlane, G. T. (1987). Short chain fatty acids in human large intestine, portal, hepatic and venous blood. *Gut*, 28(10), 1221-1227.
- Curtis, M. M., Hu, Z., Klimko, C., Narayanan, S., Deberardinis, R., & Sperandio, V. (2014). The gut commensal *Bacteroides thetaiotaomicron* exacerbates enteric infection through modification of the metabolic landscape. *Cell host & microbe*, 16(6), 759-769.
- Dautin, N. (2010). Serine protease autotransporters of enterobacteriaceae (SPATEs): biogenesis and function. *Toxins*, 2(6), 1179-1206.
- David, L. A., Maurice, C. F., Carmody, R. N., Gootenberg, D. B., Button, J. E., Wolfe, B. E., Turnbaugh, P. J. (2014). Diet rapidly and reproducibly alters the human gut microbiome. *Nature*, 505(7484), 559-563.
- den Besten, G., van Eunen, K., Groen, A. K., Venema, K., Reijngoud, D.-J., & Bakker, B. M. (2013). The role of short-chain fatty acids in the interplay between diet, gut microbiota, and host energy metabolism. *Journal of lipid research*, 54(9), 2325-2340.
- Eslava, C., Navarro-García, F., Czezulín, J. R., Henderson, I. R., Cravioto, A., & Nataro, J. P. (1998). Pet, an autotransporter enterotoxin from enteroaggregative *Escherichia coli*. *Infection and immunity*, 66(7), 3155-3163.
- Ewing, W. H. (1986). *Edwards and Ewing's identification of Enterobacteriaceae*: Elsevier Science Publishing Co. Inc.

- Farfan, M., Piemonte, P., Labra, Y., Henriquez, J., Candia, E., & Torres, J. P. (2016). [Filmarray GI TM panel for detection of enteric pathogens in stool samples: preliminary experience]. *Rev Chilena Infectol*, 33(1), 89-91.
- Farfan, M. J., & Torres, A. G. (2012). Molecular mechanisms that mediate colonization of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* strains. *Infection and immunity*, 80(3), 903-913.
- Fitzhenry, R. J., Pickard, D. J., Hartland, E. L., Reece, S., Dougan, G., Phillips, A. D., & Frankel, G. (2002). Intimin type influences the site of human intestinal mucosal colonisation by enterohaemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7. *Gut*, 50(2), 180-185.
- Friedrich, A. W., Bielaszewska, M., Zhang, W.-L., Pulz, M., Kuczus, T., Ammon, A., & Karch, H. (2002). *Escherichia coli* harboring Shiga toxin 2 gene variants: frequency and association with clinical symptoms. *The Journal of infectious diseases*, 185(1), 74-84.
- Gallardo, P., Izquierdo, M., Vidal, R. M., Chamorro-Veloso, N., Rossello-Mora, R., O'Ryan, M., & Farfan, M. J. (2017). Distinctive Gut Microbiota Is Associated with Diarrheagenic *Escherichia coli* Infections in Chilean Children. *Frontiers in cellular and infection microbiology*, 7, 424.
- Gantois, I., Ducatelle, R., Pasmans, F., Haesebrouck, F., Hautefort, I., Thompson, A., . . . Van Immerseel, F. (2006). Butyrate specifically down-regulates *salmonella* pathogenicity island 1 gene expression. *Applied and environmental microbiology*, 72(1), 946-949.
- Garner, C. D., Antonopoulos, D. A., Wagner, B., Duhamel, G. E., Keresztes, I., Ross, D. A., . . . Altier, C. (2009). Perturbation of the small intestine microbial ecology by streptomycin alters pathology in a *Salmonella enterica* serovar typhimurium murine model of infection. *Infection and immunity*, 77(7), 2691-2702.
- Harrington, S. M., Strauman, M. C., Abe, C. M., & Nataro, J. P. (2005). Aggregative adherence fimbriae contribute to the inflammatory response of epithelial cells infected with enteroaggregative *Escherichia coli*. *Cellular microbiology*, 7(11), 1565-1578.
- Hebbelstrup Jensen, B., Olsen, K. E. P., Struve, C., Kroghfelt, K. A., & Petersen, A. M. (2014). Epidemiology and clinical manifestations of enteroaggregative *Escherichia coli*. *Clinical Microbiology Reviews*, 27(3), 614-630.
- Herold, S., Paton, J. C., Srimanote, P., & Paton, A. W. (2009). Differential effects of short-chain fatty acids and iron on expression of *iha* in Shiga-toxigenic *Escherichia coli*. *Microbiology (Reading, England)*, 155(Pt 11), 3554-3563.
- Hicks, S., Frankel, G., Kaper, J. B., Dougan, G., & Phillips, A. D. (1998). Role of intimin and bundle-forming pili in enteropathogenic *Escherichia coli* adhesion to pediatric intestinal tissue in vitro. *Infection and immunity*, 66(4), 1570-1578.
- Hijova, E., & Chmelarova, A. (2007). Short chain fatty acids and colonic health. *Bratislavské lekárske listy*, 108(8), 354-358.
- Huang, Y., Suyemoto, M., Garner, C. D., Cicconi, K. M., & Altier, C. (2008). Formate Acts as a Diffusible Signal To Induce *Salmonella* Invasion. *Journal of Bacteriology*, 190(12), 4233-4241.
- Janda, J. M., Abbott, S. L., & Albert, M. J. (1999). Prototypal diarrheagenic strains of *Hafnia alvei* are actually members of the genus *Escherichia*. *Journal of clinical microbiology*, 37(8), 2399-2401.
- Kaper, J. B., Nataro, J. P., & Mobley, H. L. (2004). Pathogenic *Escherichia coli*. *Nat Rev Microbiol*, 2(2), 123-140.

- Kapwata, T., Mathee, A., le Roux, W. J., & Wright, C. Y. (2018). Diarrhoeal Disease in Relation to Possible Household Risk Factors in South African Villages. *Int J Environ Res Public Health*, *15*(8).
- Koletzko, S., & Osterrieder, S. (2009). Acute infectious diarrhea in children. *Dtsch Arztebl Int*, *106*(33), 539-547; quiz 548.
- Lackraj, T., Kim, J. I., Tran, S.-L., & Barnett Foster, D. E. (2016). Differential modulation of flagella expression in enterohaemorrhagic *Escherichia coli* O157: H7 by intestinal short-chain fatty acid mixes. *Microbiology (Reading, England)*, *162*(10), 1761-1772.
- Lawhon, S. D., Maurer, R., Suyemoto, M., & Altier, C. (2002). Intestinal short-chain fatty acids alter *Salmonella typhimurium* invasion gene expression and virulence through BarA/SirA. *Molecular microbiology*, *46*(5), 1451-1464.
- McDaniel, T. K., Jarvis, K. G., Donnenberg, M. S., & Kaper, J. B. (1995). A genetic locus of enterocyte effacement conserved among diverse enterobacterial pathogens. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *92*(5), 1664-1668.
- Miller, T. L., & Wolin, M. J. (1996). Pathways of acetate, propionate, and butyrate formation by the human fecal microbial flora. *Applied and environmental microbiology*, *62*(5), 1589-1592.
- Mohamed, J. A., Huang, D. B., Jiang, Z.-D., DuPont, H. L., Nataro, J. P., Belkind-Gerson, J., & Okhuysen, P. C. (2007). Association of putative enteroaggregative *Escherichia coli* virulence genes and biofilm production in isolates from travelers to developing countries. *Journal of clinical microbiology*, *45*(1), 121-126.
- Mohawk, K. L., Melton-Celsa, A. R., Zangari, T., Carroll, E. E., & O'Brien, A. D. (2010). Pathogenesis of *Escherichia coli* O157:H7 strain 86-24 following oral infection of BALB/c mice with an intact commensal flora. *Microbial pathogenesis*, *48*(3-4), 131-142.
- Morin, N., Santiago, A. E., Ernst, R. K., Guillot, S. J., & Nataro, J. P. (2013). Characterization of the AggR regulon in enteroaggregative *Escherichia coli*. *Infection and immunity*, *81*(1), 122-132.
- Müsken, A., Bielaszewska, M., Greune, L., Schweppe, C. H., Müthing, J., Schmidt, H., Zhang, W. (2008). Anaerobic conditions promote expression of Sfp fimbriae and adherence of sorbitol-fermenting enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:NM to human intestinal epithelial cells. *Applied and environmental microbiology*, *74*(4), 1087-1093.
- Nataro, J. P., Hicks, S., Phillips, A. D., Vial, P. A., & Sears, C. L. (1996). T84 cells in culture as a model for enteroaggregative *Escherichia coli* pathogenesis. *Infection and immunity*, *64*(11), 4761-4768.
- Nataro, J. P., & Kaper, J. B. (1998). Diarrheagenic *Escherichia coli*. *Clinical Microbiology Reviews*, *11*(1), 142-201.
- Nataro, J. P., Yikang, D., Yingkan, D., & Walker, K. (1994). AggR, a transcriptional activator of aggregative adherence fimbria I expression in enteroaggregative *Escherichia coli*. *Journal of bacteriology*, *176*(15), 4691-4699.
- Natividad, J. M. M., & Verdu, E. F. (2013). Modulation of intestinal barrier by intestinal microbiota: Pathological and therapeutic implications. *Pharmacological Research*, *69*(1), 42-51.
- Navarro-Garcia, F. (2014). *Escherichia coli* O104:H4 Pathogenesis: an Enteroaggregative *E. coli*/Shiga Toxin-Producing *E. coli* Explosive Cocktail of High Virulence. *Microbiology spectrum*, *2*(6), 10.1128/microbiolspec.EHEC-0008-2013.

- Nguyen, Y., & Sperandio, V. (2012). Enterohemorrhagic *E. coli* (EHEC) pathogenesis. *Frontiers in cellular and infection microbiology*, 2, 90-90.
- O'Brien, A. D., & LaVeck, G. D. (1983). Purification and characterization of a *Shigella dysenteriae* 1-like toxin produced by *Escherichia coli*. *Infection and immunity*, 40(2), 675-683.
- Oaks, J. L., Besser, T. E., Walk, S. T., Gordon, D. M., Beckmen, K. B., Burek, K. A., Whittam, T. S. (2010). *Escherichia albertii* in wild and domestic birds. *Emerging infectious diseases*, 16(4), 638-646.
- Obata, F., Tohyama, K., Bonev, A. D., Kolling, G. L., Keepers, T. R., Gross, L. K., Obrig, T. G. (2008). Shiga toxin 2 affects the central nervous system through receptor globotriaosylceramide localized to neurons. *The Journal of infectious diseases*, 198(9), 1398-1406.
- Paton, J. C., & Paton, A. W. (1998). Pathogenesis and diagnosis of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* infections. *Clinical microbiology reviews*, 11(3), 450-479.
- Pletnev, P., Osterman, I., Sergiev, P., Bogdanov, A., & Dontsova, O. (2015). Survival guide: *Escherichia coli* in the stationary phase. *Acta Naturae*, 7(4), 22-33.
- Qu, M., Lv, B., Zhang, X., Yan, H., Huang, Y., Qian, H., Wang, Q. (2016). Prevalence and antibiotic resistance of bacterial pathogens isolated from childhood diarrhea in Beijing, China (2010-2014). *Gut pathogens*, 8, 31-31.
- Rocha-Ramírez, L. M., Hernández-Chiñas, U., Baños-Rojas, D., Xicohtencatl-Cortés, J., Chávez-Berrocal, M. E., Rico-Rosillo, G., Eslava, C. A. (2016). Pet serine protease from enteroaggregative *Escherichia coli* stimulates the inflammatory response activating human macrophages. *BMC Microbiology*, 16(1), 158.
- Roussel, C., Cordonnier, C., Galia, W., Le Goff, O., Thévenot, J., Chalancon, S., Blanquet-Diot, S. (2016). Increased EHEC survival and virulence gene expression indicate an enhanced pathogenicity upon simulated pediatric gastrointestinal conditions. *Pediatric research*, 80(5), 734-743.
- Sa-Pessoa, J., Paiva, S., Ribas, D., Silva, I. J., Viegas, S. C., Arraiano, C. M., & Casal, M. (2013). SATP (YaaH), a succinate-acetate transporter protein in *Escherichia coli*. *Biochem J*, 454(3), 585-595.
- Schüller, S., Frankel, G., & Phillips, A. D. (2004). Interaction of Shiga toxin from *Escherichia coli* with human intestinal epithelial cell lines and explants: Stx2 induces epithelial damage in organ culture. *Cellular microbiology*, 6(3), 289-301.
- Sinclair, J. F., & O'Brien, A. D. (2002). Cell surface-localized nucleolin is a eukaryotic receptor for the adhesin intimin-gamma of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7. *The Journal of biological chemistry*, 277(4), 2876-2885.
- Stecher, B., Robbiani, R., Walker, A. W., Westendorf, A. M., Barthel, M., Kremer, M., Hardt, W.-D. (2007). *Salmonella enterica* serovar typhimurium exploits inflammation to compete with the intestinal microbiota. *PLoS biology*, 5(10), 2177-2189.
- Steiner, T. S., Lima, A. A., Nataro, J. P., & Guerrant, R. L. (1998). Enteroaggregative *Escherichia coli* produce intestinal inflammation and growth impairment and cause interleukin-8 release from intestinal epithelial cells. *The Journal of infectious diseases*, 177(1), 88-96.
- Thevenot, J., Etienne-Mesmin, L., Denis, S., Chalancon, S., Alric, M., Livrelli, V., & Blanquet-Diot, S. (2013). Enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 survival in an in vitro model of the human large intestine and interactions with probiotic yeasts and resident microbiota. *Applied and environmental microbiology*, 79(3), 1058-1064.

- Tobe, T., Nakanishi, N., & Sugimoto, N. (2011). Activation of motility by sensing short-chain fatty acids via two steps in a flagellar gene regulatory cascade in enterohemorrhagic *Escherichia coli*. *Infection and immunity*, 79(3), 1016-1024.
- Valgepea, K., Adamberg, K., Nahku, R., Lahtvee, P.-J., Arike, L., & Vilu, R. (2010). Systems biology approach reveals that overflow metabolism of acetate in *Escherichia coli* is triggered by carbon catabolite repression of acetyl-CoA synthetase. *BMC Systems Biology*, 4(1), 166.
- van der Knaap, J. A., & Verrijzer, C. P. (2016). Undercover: gene control by metabolites and metabolic enzymes. *Genes & development*, 30(21), 2345-2369.
- Vergara, A. F., Vidal, R. M., Torres, A. G., & Farfan, M. J. (2015). Long polar fimbriae participates in the induction of neutrophils transepithelial migration across intestinal cells infected with enterohemorrhagic *E. coli* O157:H7. *Frontiers in cellular and infection microbiology*, 4, 185-185.
- Waight, A. B., Love, J., & Wang, D.-N. (2010). Structure and mechanism of a pentameric formate channel. *Nature structural & molecular biology*, 17(1), 31-37.
- Wu, G. D., Chen, J., Hoffmann, C., Bittinger, K., Chen, Y.-Y., Keilbaugh, S. A., Lewis, J. D. (2011). Linking long-term dietary patterns with gut microbial enterotypes. *Science (New York, N.Y.)*, 334(6052), 105-108.
- Yang, F., Yang, L., Chang, Z., Chang, L., & Yang, B. (2018). Regulation of virulence and motility by acetate in enteropathogenic *Escherichia coli*. *Int J Med Microbiol*, 308(7), 840-847.